



Institut für Ernährungswissenschaft
Justus-Liebig-Universität Giessen

Optimierte HPLC-Analytik zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit
von freiem und gebundenem Vitamin B6
in physiologischen Konzentrationen beim Menschen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades am Fachbereich
"Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement"
der Justus-Liebig-Universität

eingereicht von
Dipl oec troph H Christian Borsch

Giessen 2002

Inhalt (Kurzübersicht)

	0. Verzeichnisse	3
	0.1. Inhalt.....	3
5	0.2. Abbildungen	7
	0.3. Tabellen	17
	0.4. Abkürzungen	22
	1. Einleitung.....	23
	1.1. Ziel	23
10	1.2. Begriffsdefinitionen	24
	2. Literaturübersicht	26
	2.1. Bioverfügbarkeit des B6.....	28
	2.2. Analytische Methoden	28
	2.3. biokinetische Untersuchungen	37
15	3. Material und Methoden	39
	3.1. Material.....	39
	3.2. Methodische Arbeiten.....	41
	3.3. Humanstudien	53
	4. Ergebnisse	61
20	4.1. Lebensmittel.....	61
	4.2. Versuche zur Biokinetik	63
	4.3. Biokinetische Auswertungen	75
	5. Diskussion.....	96
	5.1. Methoden.....	96
25	5.2. Diskussion der Ergebnisse	105
	5.3. Fazit.....	114
	6. Zusammenfassung.....	115
	6.1. Literatur	118
	7. Anhang.....	132
30	7.1. Allgemeines.....	132
	7.2. Messwerte.....	135
	7.3. Eichung und Kalibrierung.....	207

0. Verzeichnisse

0.1. Inhalt

	0. Verzeichnisse.....	3
	0.1. Inhalt.....	3
5	0.2. Abbildungen	7
	0.3. Tabellen	17
	0.4. Abkürzungen	22
	1. Einleitung.....	23
	1.1. Ziel	23
10	1.2. Begriffsdefinitionen	24
	2. Literaturübersicht	26
	2.1. Bioverfügbarkeit des B6.....	28
	2.2. Analytische Methoden	28
	2.2.1. Methoden nach Vanderslice 1979 und Coburn 1983.....	30
15	2.2.2. Methoden nach Gregory 1978	31
	2.2.3. Methoden nach Tsuge 1986	32
	2.2.4. Methoden nach Williams 1979.....	32
	2.2.5. Methoden nach Pierotti 1984.....	33
	2.2.6. Methoden nach Gregory 1985	33
20	2.2.7. Methoden nach Bitsch und Möller 1990.....	34
	2.2.8. Methoden nach Edwards 1989 und Kimura 1996	35
	2.2.9. weitere HPLC-Verfahren.....	35
	2.2.10. Nicht-HPLC Bestimmungen	36
	2.3. biokinetische Untersuchungen.....	37
25	3. Material und Methoden	39
	3.1. Material	39
	3.1.1. Bezugsquellen	39
	3.1.2. Reagenzien	39
	3.1.2.1. Verbrauchsmaterialien.....	39
30	3.1.2.2. Standards.....	39
	3.1.3. Geräte	40
	3.2. Methodische Arbeiten	41
	3.2.1. Analytische Methodik	41
	3.2.1.1. Chromatografische Methode.....	41
35	3.2.1.1.1. Elution	41
	3.2.1.1.2. Pumpensteuerung	41

	3.2.1.1.3. Detektion	43
	3.2.1.2. Quantifizierung	44
	3.2.1.2.1. Eichung	44
	3.2.1.2.2. Umrechnungsfaktoren.....	44
5	3.2.1.2.3. Identifikation.....	44
	3.2.1.2.4. Stammlösungen	44
	3.2.1.3. Validierung.....	45
	3.2.2. Variationen	45
	3.2.2.1. Mobile und feste Phase	45
10	3.2.2.2. Gradientenelution	46
	3.2.2.3. andere chromatografische Parameter.....	46
	3.2.3. Lebensmittelauswahl	46
	3.2.4. Probenaufbereitung	47
	3.2.4.1. Lebensmittel	47
15	3.2.4.1.1. Kohlgemüse	47
	3.2.4.1.2. andere feste Lebensmittel	47
	3.2.4.1.3. Getränke und Lösungen.....	47
	3.2.4.2. Blut	48
	3.2.4.3. Urin	48
20	3.2.4.4. gemeinsame Aufbereitungsschritte	48
	3.2.4.5. Enzymatischer Aufschluss.....	49
	3.2.5. Kinetische Vorversuche	51
	3.3. Humanstudien	53
	3.3.1. Probengewinnung	53
25	3.3.1.1. Trinklösungen	53
	3.3.1.2. Blutentnahmen.....	53
	3.3.1.3. Urinsammlung	53
	3.3.1.4. Lagerung	54
	3.3.2. Versuchsdurchführung.....	54
30	3.3.2.1. Testreihe 1 (Tiefkühlblumenkohl)	55
	3.3.2.2. Testreihe 2 (marktfrischer Blumenkohl).....	55
	3.3.2.3. Testreihe 3 (Pyridoxin p.o. – prop.)	55
	3.3.2.4. Testreihe 4 (Pyridoxin p.o. – 1,5mg).....	56
	3.3.2.5. Testreihe 5 (Karottensaft)	56
35	3.3.2.6. Testreihe 6 (Pyridoxin i.v.)	56
	3.3.2.7. Ablauf der Versuchstage	56
	3.3.3. Auswertungen.....	57
	3.3.3.1. deskriptive Statistik.....	57

	3.3.3.2.	grafische Darstellung	58
	3.3.3.3.	biokinetische Parameter	59
	3.3.3.4.	Berechnung der Bioverfügbarkeit.....	59
	4.	Ergebnisse	61
5	4.1.	Lebensmittel	61
	4.2.	Versuche zur Biokinetik	63
	4.2.1.	Basisexkretion	63
	4.2.2.	Testreihe 1	64
	4.2.3.	Testreihe 2	65
10	4.2.4.	Testreihen 3 und 4	67
	4.2.5.	Testreihe 5	70
	4.2.6.	Testreihe 6	72
	4.3.	Biokinetische Auswertungen	75
	4.3.1.	Versuchsperson 01	75
15	4.3.2.	Versuchspersonen 02 und 03	79
	4.3.3.	Mittelwerte.....	87
	4.3.3.1.	Testreihen 4 und 5	87
	4.3.3.2.	Testreihen 1, 2 und 3.....	89
	4.3.4.	Bioverfügbarkeit.....	90
20	4.3.4.1.	Versuchsperson 01	90
	4.3.4.2.	alle Versuchspersonen	92
	5.	Diskussion.....	96
	5.1.	Methoden	96
	5.1.1.	Nüchternwerte	96
25	5.1.2.	weitere Parameter	99
	5.1.3.	Kritik des analytischen Verfahrens	100
	5.1.3.1.	Prinzipielle Überlegungen	100
	5.1.3.2.	Potenzielle Verbesserungen	102
	5.2.	Diskussion der Ergebnisse	105
30	5.2.1.	Lebensmittel	105
	5.2.2.	Biokinetische Versuche	106
	5.2.3.	Exkurs: Ergänzende Untersuchungen zur PNG-Absorption	112
	5.3.	Fazit.....	114
	6.	Zusammenfassung.....	115
35	6.1.	Literatur	118
	7.	Anhang	132
	7.1.	Allgemeines	132

	7.1.1.	Chromatogramme	132
	7.1.2.	Sonstige Daten.....	133
	7.2.	Messwerte.....	135
	7.2.1.	Kinetische Versuche	135
5	7.2.1.1.	Urinvolumina	135
	7.2.1.2.	Konzentrationen der einzelnen B6-Formen	135
	7.2.1.3.	grafische Darstellungen.....	161
	7.2.1.4.	Kinetische Auswertungen	188
	7.2.2.	Lebensmittel	204
10	7.2.2.1.	sonstige Lösungen.....	204
	7.2.2.2.	Sprossen, Keimlinge.....	205
	7.2.3.	Chromatografische Methode	205
	7.3.	Eichung und Kalibrierung.....	207
	7.3.1.	Eichgeraden Wasser	207
15	7.3.2.	Eichgeraden Plasma	208
	7.3.3.	Eichgeraden Urin.....	209
	7.3.4.	Eichgeraden Blumenkohl.....	210
	7.3.5.	Eichgeraden Saft	211
	7.3.6.	Zusammenfassung der Eichwerte	212
20	7.3.7.	Interserien-Schwankungen	213
	7.3.8.	Intraserien-Schwankungen	213
	7.3.9.	Wiederfindung	213

0.2. Abbildungen

Abbildungen

	Abbildung 1: Struktur der wichtigsten Pyridoxin-Derivate.....	26
5	Abbildung 2: Grafische Darstellung der Pumpensteuerung im Mess- und Spülzyklus. x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Flussrate [ml/min]	42
	Abbildung 3: Grafische Darstellung der Pumpensteuerung zur Säulenreinigung. x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Flussrate [ml/min]	43
	Abbildung 4 Schematischer Ablauf der Probenaufbereitung.....	51
10	Abbildung 5: Darstellung der Kompartimente und Invasions- bzw. Evasionskonstanten	59
	Abbildung 6: Relative Bioverfügbarkeit, Erläuterungen siehe vorstehende Tabelle.....	93
	Abbildung 7: Relative Bioverfügbarkeit, Erläuterungen siehe vorstehende Tabelle.....	94
	Abbildung 8: Mit stabilen Isotopen markiertes PNG	112
	Abbildung 9: Chromatogramm einer Urinprobe (mit Standards)	132
15	Abbildung 10: Chromatogramm einer Plasmaprobe (mit PLP angereichert)	132
	Abbildung 11: Plasmaprobe wie vorstehend, jedoch ohne Bisulfit im Fliessmittel	132
	Abbildung 12: Formular der Einverständniserklärung zur Studie	133
	Abbildung 13: Formular der erweiterten Probandeninformation (Beispiel)	134

Diagramme

	Diagramm 1 Testreihe_1: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_01.....	64
5	Diagramm 2 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_1, Versuchsperson_01.....	65
	Diagramm 3 Testreihe_2: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_01.....	66
	Diagramm 4 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_2, Versuchsperson_01.....	66
10	Diagramm 5 Testreihe_4: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_01.....	68
	Diagramm 6 Testreihe_3: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_01, Durchführung mit proportionaler Dosierung	68
15	Diagramm 7 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_01.....	69
	Diagramm 8 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_3, Versuchsperson_01, Durchführung mit proportionaler Dosierung	69
	Diagramm 9 Testreihe_5: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_01.....	71
20	Diagramm 10 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_01.....	71
	Diagramm 11 Testreihe_6: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_01.....	73
25	Diagramm 12 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde n Testreihe_6, Versuchsperson_01.....	73
	Diagramm 13 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_01 nach sechs Testreihen.....	75
30	Diagramm 14 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_01, Testreihe_6; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	76
	Diagramm 15 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_01, Testreihe_1; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	77

	Diagramm 16 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_01, Testreihe_2 mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	77
5	Diagramm 17 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_01, Testreihe_3; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	78
	Diagramm 18 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_01, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	78
10	Diagramm 19 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_01, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	79
	Diagramm 20 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_02 nach fünf Testreihen	80
15	Diagramm 21 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_03 nach fünf Testreihen	80
	Diagramm 22 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_02, Testreihe_1; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	82
20	Diagramm 23 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_02, Testreihe_2; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	82
	Diagramm 24 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_02, Testreihe_3; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	83
25	Diagramm 25 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_02, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	83
	Diagramm 26 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_02, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	84
30	Diagramm 27 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_03, Testreihe_1; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	84

	Diagramm 28 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_03, Testreihe_2; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	85
5	Diagramm 29 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_03, Testreihe_3; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	85
	Diagramm 30 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_03, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	86
10	Diagramm 31 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_03, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	86
	Diagramm 32: Vitamin B6 im Plasma nach Testreihe 4 bzw. 5. Mittelwert aller 12 Probanden.....	89
15	Diagramm 33 Bioverfügbarkeit bei Versuchsperson_01, berechnet über Plasma-AUC.....	91
	Diagramm 34 Bioverfügbarkeit bei Versuchsperson_01, berechnet über Netto-Exkretion	92
20	Diagramm 35: Relation von applizierter Dosis PN-HCl und resultierender Plasma-Netto- $c_{\max}$ bzw. AUC.....	107
	Diagramm 36 Testreihe_1: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_02.....	161
	Diagramm 37 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_1, Versuchsperson_02.....	161
25	Diagramm 38 Testreihe_1: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_03.....	162
	Diagramm 39 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_1, Versuchsperson_03.....	162
30	Diagramm 40 Testreihe_2: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_02.....	163
	Diagramm 41 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_2, Versuchsperson_02.....	163
	Diagramm 42 Testreihe_2: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_03.....	164

	Diagramm 43 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_2, Versuchsperson_03.....	164
	Diagramm 44 Testreihe_4: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_02.....	165
5	Diagramm 45 Testreihe_3: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_02.....	165
	Diagramm 46 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_02.....	166
	Diagramm 47 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_3, Versuchsperson_02.....	166
10	Diagramm 48 Testreihe_4: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_03.....	167
	Diagramm 49 Testreihe_3: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_03.....	167
15	Diagramm 50 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_03.....	168
	Diagramm 51 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_3, Versuchsperson_03.....	168
	Diagramm 52 Testreihe_4: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_04.....	169
20	Diagramm 53 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_04.....	169
	Diagramm 54 Testreihe_4: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_05.....	170
25	Diagramm 55 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_05.....	170
	Diagramm 56 Testreihe_4: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_06.....	171
	Diagramm 57 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_06.....	171
30	Diagramm 58 Testreihe_4: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_07.....	172

	Diagramm 59 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_07.....	172
	Diagramm 60 Testreihe_4: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_08.....	173
5	Diagramm 61 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_08.....	173
	Diagramm 62 Testreihe_4: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_09.....	174
10	Diagramm 63 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_09.....	174
	Diagramm 64 Testreihe_4: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_10.....	175
	Diagramm 65 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_10.....	175
15	Diagramm 66 Testreihe_4: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_11.....	176
	Diagramm 67 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_11.....	176
20	Diagramm 68 Testreihe_4: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_12.....	177
	Diagramm 69 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_12.....	177
	Diagramm 70 Testreihe_5: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_02.....	178
25	Diagramm 71 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_02.....	178
	Diagramm 72 Testreihe_5: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_03.....	179
30	Diagramm 73 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_03.....	179
	Diagramm 74 Testreihe_5: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_04.....	180

	Diagramm 75 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_04.....	180
	Diagramm 76 Testreihe_5: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_05.....	181
5	Diagramm 77 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde n Testreihe_5, Versuchsperson_05.....	181
	Diagramm 78 Testreihe_5: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_06.....	182
10	Diagramm 79 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_06.....	182
	Diagramm 80 Testreihe_5: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_07.....	183
	Diagramm 81 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_07.....	183
15	Diagramm 82 Testreihe_5: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_08.....	184
	Diagramm 83 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde n Testreihe_5, Versuchsperson_08.....	184
20	Diagramm 84 Testreihe_5: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_09.....	185
	Diagramm 85 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_09.....	185
	Diagramm 86 Testreihe_5: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_10.....	186
25	Diagramm 87 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_10.....	186
	Diagramm 88 Testreihe_5: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_11.....	187
30	Diagramm 89 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde n Testreihe_5, Versuchsperson_11.....	187
	Diagramm 90 Testreihe_5: PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_12.....	188

	Diagramm 91 Exkretion PA und <Vitamin B6+PA> je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_12.....	188
	Diagramm 92 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_04 nach zwei Testreihen	189
5	Diagramm 93 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_05 nach zwei Testreihen	189
	Diagramm 94 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_06 nach zwei Testreihen	190
10	Diagramm 95 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_07 nach zwei Testreihen	190
	Diagramm 96 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_08 nach zwei Testreihen	191
	Diagramm 97 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_09 nach zwei Testreihen	191
15	Diagramm 98 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_10 nach zwei Testreihen	192
	Diagramm 99 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_11 nach zwei Testreihen	192
20	Diagramm 100 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_12 nach zwei Testreihen	193
	Diagramm 101 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_04, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	195
25	Diagramm 102 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_04, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	195
	Diagramm 103 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_05, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	196
30	Diagramm 104 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_05, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	196

	Diagramm 105 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_06, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	197
5	Diagramm 106 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_06, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	197
	Diagramm 107 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_07, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	198
10	Diagramm 108 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_07, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	198
	Diagramm 109 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_08, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	199
15	Diagramm 110 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_08, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	199
	Diagramm 111 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_09, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	200
20	Diagramm 112 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_09, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	200
	Diagramm 113 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_10, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	201
25	Diagramm 114 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_10, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	201
30	Diagramm 115 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_11, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	202

	Diagramm 116 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_11, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell	202
5	Diagramm 117 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_12, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	203
	Diagramm 118 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_12, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell.....	203
10	Diagramm 119: Zunahme des freien PN beim Inkubieren von Proben.....	206
	Diagramm 120 Eichgeraden der B6-Formen, Matrix: Bidest.....	207
	Diagramm 121 Eichgeraden der B6-Formen, Matrix: Plasma	208
	Diagramm 122 Eichgeraden der B6-Formen, Matrix: Urin.....	209
	Diagramm 123 Eichgeraden der B6-Formen, Matrix: Blumenkohlzubereitung	210
15	Diagramm 124 Eichgeraden der B6-Formen, Matrix: Karottensaft.....	211

20

Gleichungen

Gleichung 1 zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit (BV) gebundener B6-Formen aus bekannten Werten für BV und Gehalt (b)	60
--	----

0.3. Tabellen

	Tabelle 1: Schematische Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Begriffe zu "Vitamin B6"	24
	Tabelle 2: Fließmittelzusammensetzung des HPLC-Systems	41
5	Tabelle 3 Methodenparameter (HPLC) im Vergleich zu Kimura 1996	45
	Tabelle 4 Methodenparameter (Enzymbehandlung) im Vergleich zu Sierra 1997	49
	Tabelle 5: Zuordnung der Versuchspersonen zu den Testreihen der Hauptversuche...	54
	Tabelle 6 Säfte: Gehalt an B6-Formen	61
	Tabelle 7 Kohlgemüse: Gehalt an B6-Formen in verzehrsfertiger Form.....	62
10	Tabelle 8 Nüchternexkretion der Versuchspersonen	63
	Tabelle 9 Mittelwerte der Nüchternexkretion der zwölf Versuchspersonen	64
	Tabelle 10 Applizierte Mengen an Vitamin B6 in Testreihe 1.....	65
	Tabelle 11 Applizierte Mengen an Vitamin B6 in Testreihe 2.....	67
	Tabelle 12 Applizierte Mengen an Vitamin B6 in Testreihe 3 und 4	70
15	Tabelle 13 Applizierte Mengen an Vitamin B6 in Testreihe 5.....	72
	Tabelle 14 Biokinetische Parameter und Kenngrößen zur Modellzuverlässigkeit für Versuchsperson_01 in den durchgeführten Testreihen	76
	Tabelle 15 Biokinetische Parameter und Kenngrößen zur Modellzuverlässigkeit für Versuchspersonen 02 und 03 in den durchgeführten Testreihen	80
20	Tabelle 16 Vergleich der AUC aus Testreihe 4 (=100%) und 5, 2-Komp.-Modell von totalem Plasma-Vitamin B6 (Nettowerte).	87
	Tabelle 17 Vergleich von Tmax [min] aus Testreihe 4 (=100%) und 5, 2-Komp.-Modell von totalem Plasma-Vitamin B6.....	88
25	Tabelle 18 Vergleich der 9h-Nettoexkretionen von totalem Gesamt- B6 in Testreihe 4 (=100%) und 5	88
	Tabelle 19 Vergleich der AUC aus Testreihe 3 (=100%) sowie 1 und 2, 2-Komp.-Modell von totalem Plasma-Vitamin B6 (Nettowerte).	89
	Tabelle 20 Vergleich von Tmax [min] aus Testreihe 4 (=100%) sowie 2 und 3, 2-Komp.-Modell von totalem Plasma-Vitamin B6.....	90
30	Tabelle 21 Vergleich der 7h-Nettoexkretionen von totalem Gesamt- B6 in Testreihe 4 (=100%) sowie 2 und 3	90

	Tabelle 22 Relative Bioverfügbarkeit, berechnet über Plasma-AUC (Nettowerte), Testreihe 4 (orale Reinsubstanz) für jede Versuchsperson einzeln als 100% gesetzt.	93
5	Tabelle 23 Relative Bioverfügbarkeit, berechnet über Netto-Exkretion, Testreihe 4 (orale Reinsubstanz) für jede Versuchsperson einzeln als 100% gesetzt.....	94
	Tabelle 24 Relative Bioverfügbarkeit der gebundenen B6-Formen.....	94
	Tabelle 25 Plasmanüchternwerte aus verschiedenen Untersuchungen	97
	Tabelle 26: Gegenüberstellung einiger methodischer Parameter	99
	Tabelle 27: Vergleich einiger Messwerte für Lebensmittel	105
10	Tabelle 28 Zufuhrempfehlungen für Vitamin B6.....	133
	Tabelle 29 Urinausscheidung der Versuchspersonen während der ersten 8 Stunden der Testreihen	135
	Tabelle 32 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 1 [nM]	135
	Tabelle 33 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 1 [nmol/h]	135
15	Tabelle 34 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 02 in Testreihe 1 [nM]	136
	Tabelle 35 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 02 in Testreihe 1 [nmol/h]	136
	Tabelle 36 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 03 in Testreihe 1 [nM]	137
	Tabelle 37 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 03 in Testreihe 1 [nmol/h]	137
	Tabelle 38 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 2 [nM]	137
20	Tabelle 39 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 2 [nmol/h]	138
	Tabelle 40 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 02 in Testreihe 2 [nM]	138
	Tabelle 41 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 02 in Testreihe 2 [nmol/h]	138
	Tabelle 42 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 03 in Testreihe 2 [nM]	139
	Tabelle 43 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 03 in Testreihe 2 [nmol/h]	139
25	Tabelle 46 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 3 [nM]	139
	Tabelle 47 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 3 [nmol/h]	140
	Tabelle 50 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 02 in Testreihe 3 [nM]	140
	Tabelle 51 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 02 in Testreihe 3 [nmol/h]	140
	Tabelle 54 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 03 in Testreihe 3 [nM]	141
30	Tabelle 55 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 03 in Testreihe 3 [nmol/h]	141
	Tabelle 44 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 4 [nM]	141
	Tabelle 45 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 4 [nmol/h]	142

	Tabelle 48	Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 02 in Testreihe 4 [nM]	142
	Tabelle 49	Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 02 in Testreihe 4 [nmol/h]	142
	Tabelle 52	Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 03 in Testreihe 4 [nM]	143
	Tabelle 53	Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 03 in Testreihe 4 [nmol/h]	143
5	Tabelle 56	Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 04 in Testreihe 4 [nM]	143
	Tabelle 57	Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 04 in Testreihe 4 [nmol/h]	144
	Tabelle 58	Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 05 in Testreihe 4 [nM]	144
	Tabelle 59	Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 05 in Testreihe 4 [nmol/h]	145
	Tabelle 60	Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 06 in Testreihe 4 [nM]	145
10	Tabelle 61	Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 06 in Testreihe 4 [nmol/h]	145
	Tabelle 62	Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 07 in Testreihe 4 [nM]	146
	Tabelle 63	Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 07 in Testreihe 4 [nmol/h]	146
	Tabelle 64	Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 08 in Testreihe 4 [nM]	146
	Tabelle 65	Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 06 in Testreihe 4 [nmol/h]	147
15	Tabelle 66	Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 09 in Testreihe 4 [nM]	147
	Tabelle 67	Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 09 in Testreihe 4 [nmol/h]	148
	Tabelle 68	Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 10 in Testreihe 4 [nM]	148
	Tabelle 69	Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 10 in Testreihe 4 [nmol/h]	148
	Tabelle 70	Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 11 in Testreihe 4 [nM]	149
20	Tabelle 71	Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 11 in Testreihe 4 [nmol/h]	149
	Tabelle 72	Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 12 in Testreihe 4 [nM]	149
	Tabelle 73	Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 12 in Testreihe 4 [nmol/h]	150
	Tabelle 74	Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 5 [nM]	150
	Tabelle 75	Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 5 [nmol/h]	151
25	Tabelle 76	Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 02 in Testreihe 5 [nM]	151
	Tabelle 77	Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 02 in Testreihe 5 [nmol/h]	152
	Tabelle 78	Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 03 in Testreihe 5 [nM]	152
	Tabelle 79	Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 03 in Testreihe 5 [nmol/h]	152
	Tabelle 80	Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 04 in Testreihe 5 [nM]	153
30	Tabelle 81	Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 04 in Testreihe 5 [nmol/h]	153
	Tabelle 82	Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 05 in Testreihe 5 [nM]	153

	Tabelle 83 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 05 in Testreihe 5 [nmol/h]	154
	Tabelle 84 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 06 in Testreihe 5 [nM]	154
	Tabelle 85 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 06 in Testreihe 5 [nmol/h]	154
	Tabelle 86 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 07 in Testreihe 5 [nM]	155
5	Tabelle 87 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 07 in Testreihe 5 [nmol/h]	155
	Tabelle 88 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 08 in Testreihe 5 [nM]	156
	Tabelle 89 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 08 in Testreihe 5 [nmol/h]	156
	Tabelle 90 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 09 in Testreihe 5 [nM]	156
	Tabelle 91 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 09 in Testreihe 5 [nmol/h]	157
10	Tabelle 92 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 10 in Testreihe 5 [nM]	157
	Tabelle 93 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 10 in Testreihe 5 [nmol/h]	157
	Tabelle 94 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 11 in Testreihe 5 [nM]	158
	Tabelle 95 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 11 in Testreihe 5 [nmol/h]	158
	Tabelle 96 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 12 in Testreihe 5 [nM]	159
15	Tabelle 97 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 12 in Testreihe 5 [nmol/h]	159
	Tabelle 30 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 6 [nM]	159
	Tabelle 31 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 6 [nmol/h]	160
	Tabelle 98 Biokinetische Parameter und Kenngrößen zur Modellzuverlässigkeit für Versuchspersonen (VP) 04 bis 12 in den Testreihen (T) 4 und 5.....	193
20	Tabelle 99 Sonstige Flüssigkeiten: Gehalt an B6-Formen [nmol/l] in verzehrsfertiger Form.....	204
	Tabelle 100 Sprossen und Keimlinge: Gehalt an B6-Formen [nmol/100g] in verzehrsfertiger Form	205
	Tabelle 101 Freie B6-Formen [nmol/l] im Nüchternblut von Versuchsperson 01 nach verschiedenen Aufbereitungen.	205
25	Tabelle 102 Messwerte (Peakflächen) der Eichreihe in Bidest	207
	Tabelle 103 Messwerte (Peakflächen) der Eichreihe in Plasma.....	208
	Tabelle 104 Messwerte (Peakflächen) der Eichreihe in Urin	209
	Tabelle 105 Messwerte (Peakflächen) der Eichreihe in Blumenkohlzubereitung	210
30	Tabelle 106 Messwerte (Peakflächen) der Eichreihe in Karottensaft	211
	Tabelle 107 Übersicht der Eichgeraden und Messgrenzen [nmol/l].....	212
	Tabelle 108 Interserien-Schwankung (Mittelwert in verschiedenen Matrices)	213

Tabelle 109 Interserien-Schwankung (Mittelwert in verschiedenen Matrizes).....	213
Tabelle 110 Wiederfindungsraten (%) in verschiedenen Matrizes	213

0.4. Abkürzungen

Neben den SI-Einheiten und den daraus abgeleiteten Grössen wurden in dieser Arbeit folgende Abkürzungen benutzt:

5	PN	Pyridoxin (Pyridoxol) – immer nur als Bezeichnung für das spezifische Vitamin gebraucht, nicht stellvertretend für "Vitamin B6". Zur Abgrenzung der Begriffe siehe Tabelle 1 auf Seite 24.
	PNP	Pyridoxamin-Phosphat
	PNG	Pyridoxin- β -Glucosid
	PN-HCl	Pyridoxin-Hydrochlorid
10	dPN	Deoxypyridoxin (nicht vitaminwirksam, als ext. Standard eingesetzt)
	PA	Pyridoxinsäure
	PL	Pyridoxal
	PLP	Pyridoxalphosphat
	PM	Pyridoxamin
15	PMP	Pyridoxaminphosphat
	AUC	Fläche unter der Kurve
	Bidest	doppelt entmineralisiertes Wasser
	Bisulfit	Hydrogensulfit
	BK	Blumenkohl
20	BV	Bioverfügbarkeit
	eASAT	erythrozytäre Aspartat-Aminotransferase
	E, I, R	Probenbezeichnungen (siehe Abbildung 4 auf Seite 51) E Enzyminkubiert, I Inkubiert ohne Enzym, R nicht inkubiert ("roh")
	Glc	Glucose
25	GLD	β -Glucosidase
	HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatografie
	IRMS	Massenratiometrie (Isotopenverhältnis-MS)
	MS	Massenspektrometrie
30	T1...T6	Testreihe im Hauptversuch T1 - Tiefkühl-Blumenkohl (3 VP) T2 - marktfrischer Blumenkohl (3 VP) T3 - p.o.-Applikation PN-HCl prop. (3 VP) T4 - p.o.-Applikation PN-HCl konst (12 VP) T5 - Karottensaft (12 VP) T6 - i.v.-Applikation PN-HCl (1 VP)
35	TCA	Trichloressigsäure
	VP	Versuchsperson(en)

1. Einleitung

1.1. Ziel

Zur Quantifizierung von Vitamin B6 steht eine Reihe von HPLC-Verfahren zur Verfügung. Diese z.T. sehr komplexen Techniken wurden mit Blick auf ihre jeweiligen Einsatzgebiete, z.B. Qualitätskontrolle bei der Herstellung pharmazeutischer Zubereitungen oder zur Statusbestimmung in der klinischen Chemie, als Ersatz für die nur bedingt aussagekräftigen enzymatischen Verfahren optimiert.

Diese hohe Spezialisierung ist zugleich ein grosser Nachteil, da Messergebnisse aus unterschiedlichen Bestimmungsverfahren wegen der differierenden Vitaminspezifität nur näherungsweise vergleichbar sind. Die einfache Anwendung eines auf eine andere Probenmatrix spezialisierten Verfahrens kann wegen der Potenzierung der systemischen Fehler zu wenig zuverlässigen Daten führen. Daher wurde es nicht Aufgabe angesehen, noch eine weitere spezialisierte Bestimmungsmethode für Vitamin B6 bereitzustellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine universelle Methode zu entwickeln, die in allen ernährungsphysiologisch relevanten Matrices mindestens akzeptable Ergebnisse liefert und die zudem aufgrund einheitlicher Probenaufbereitung und Messtechniken einen aussagekräftigen Vergleich zwischen verschiedenen Biomatrices erlaubt.

In einem zweiten Schritt sollte die so bereitgestellte Analytik auf eine exemplarische biokinetische Fragestellung zur Bioverfügbarkeit von Vitamin B6 aus verzehrsüblichen Lebensmitteln angewendet werden. Dazu wurde die Analytik um einen Schritt zur Quantifizierung von Vitamin B6-Glucosiden erweitert und es wurden in-vivo Studien an bis zu zwölf Probanden durchgeführt.

Im Gegensatz zu anderen publizierten Untersuchungen, die entweder unphysiologische Darreichungsformen oder Dosierungen einsetzten, sollten hierbei nur Einmaldosen in Form eines verzehrsüblichen Lebensmittels und mit physiologischer Vitaminmenge, d.h. in Höhe der Zufuhrempfehlungen, verabreicht werden.

Für die Anwendung der entwickelten Analytik wurde dieser biokinetische Ansatz gewählt, weil zur Fragestellung der tatsächlichen Bioverfügbarkeit für den Menschen von gebundenem Vitamin B6 aus Lebensmitteln auch heute noch keine endgültigen Daten vorliegen und sich Erkenntnisse aus Tierstudien als nicht übertragbar erwiesen haben (Gregory 1997 [53]).

1.2. Begriffsdefinitionen

Da in der Literatur und im alltäglichen Sprachgebrauch der Begriff *Vitamin B6* häufig uneinheitlich gebraucht wird, soll zunächst die weitere Verwendung einiger Begriffe für die vorliegende Arbeit definiert werden.

5

Tabelle 1: Schematische Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Begriffe zu "Vitamin B6"

Begriff	Bedeutung	Erläuterung
Vitamer	PLP PMP PL PM PN	als einzelne Substanz
Vitamin B6	Σ (PLP PMP PL PM PN)	als molare Summe
B6-Form	PLP PMP PL PM PN PA	als einzelne Substanz
<Vitamin B6+PA>	Σ (PLP PMP PL PM PN) + PA	als molare Summe
Freies Vitamin B6	Menge vor / ohne Inkubation	
Totales Vitamin B6	Menge nach Inkubation	
Gebundenes Vitamin B6	Mengendifferenz (nach – vor) Inkubation	

Vitamere

- 10 Der Begriff "Vitamere" bezeichnet die einzelnen Pyridin-Derivate, denen eine hohe oder vollständige Vitaminwirksamkeit zugemessen wird, namentlich Pyridoxal-5'-phosphat (PLP), Pyridoxal (PL), Pyridoxamin-5'-phosphat (PMP), Pyridoxamin (PM) und Pyridoxin (PN)¹.

- Andere Pyridin-Derivate ohne oder mit nur geringer Vitaminwirksamkeit sollen
15 im weiteren nicht als "Vitamere" verstanden werden.

Vitamin B6

Mit "Vitamin B6" wird im Folgenden die molare Summe der vorstehend aufgezählten Vitamere bezeichnet.

- 20 Erforderlichenfalls erfolgt eine Unterscheidung zwischen "freiem Vitamin B6" und "totalem Vitamin B6". Hierbei bezeichnet "totales Vitamin B6" den unter Anwendung der in Abschnitt 3.2.4.5 beschriebenen Verfahren messbaren Vitamin B6-Gehalt einer Probe nach vollständiger Glucosidase-Behandlung, "freies Vitamin B6" den entsprechenden Wert vor bzw. ohne Glucosidase-Behandlung.

¹ Pyridoxin-5'-phosphat (PNP) wird zumindest in der älteren Literatur ebenfalls als zu 100% vitaminwirksam bezeichnet, seine Bedeutung für den Menschen ist allerdings fraglich. Quantitativ ist PNP unbedeutend, ausserdem waren während des Untersuchungszeitraums qualitativ hinreichende PNP-Standards nicht kommerziell erhältlich, daher wurde –wie bei anderen Autoren auch– PNP nicht in die vorliegenden Arbeit aufgenommen.

Die Differenz der Vitamin B6-Gehalte vor und nach einer Glucosidase-Behandlung wird als "Gebundenes Vitamin B6" bezeichnet.

<Vitamin B6+PA>

- 5 Die molare Summe aus Vitamin B6 entsprechend der vorstehend skizzierten Begriffsdefinition und dem Metaboliten 4'-Pyridoxinsäure (PA) wird als "<Vitamin B6+PA>" bezeichnet, auch hierbei erfolgt bei Bedarf eine analoge Unterscheidung nach "frei", "total" und "gebunden".

10 B6-Formen

- Da für die analytische Handhabung die Frage nach der Vitaminwirksamkeit zweitrangig ist und PA häufig eine wichtige Kenngrösse ist, wird zusätzlich bei der Beschreibung der analytischen Verfahren der Begriff "B6-Formen" verwendet. Damit sollen alle untersuchten Pyridin-Derivate bezeichnet werden, also
15 einschliesslich des nicht vitaminwirksamen Metaboliten PA.

Auszug aus dem Abkürzungsverzeichnis (S. 22):

- | | | |
|----|---------------|---|
| | <i>PN</i> | <i>Pyridoxin (Pyridoxol) – immer nur als Bezeichnung für das spezifische Vitamer gebraucht, nicht stellvertretend für "Vitamin B6".</i> |
| 20 | <i>PNG</i> | <i>Pyridoxin-β-Glucosid</i> |
| | <i>PN-HCl</i> | <i>Pyridoxin-Hydrochlorid</i> |
| | <i>PA</i> | <i>Pyridoxinsäure</i> |
| | <i>PL</i> | <i>Pyridoxal</i> |
| | <i>PLP</i> | <i>Pyridoxalphosphat</i> |
| 25 | <i>PM</i> | <i>Pyridoxamin</i> |
| | <i>PMP</i> | <i>Pyridoxaminphosphat</i> |

2. Literaturübersicht

Die Grundform des Vitamin B6 ist das 2-Methyl-3-Hydroxy-4, 5-bis-Hydroxymethyl-Pyridin (Pyridoxin, *vereinzelt: Pyridoxol*). Die 4'-Gruppe kann auch oxidiert (Pyridoxal) oder aminiert sein (Pyridoxamin). Häufig liegt die am C_{5'} Atom phosphorylierte Form vor [45].

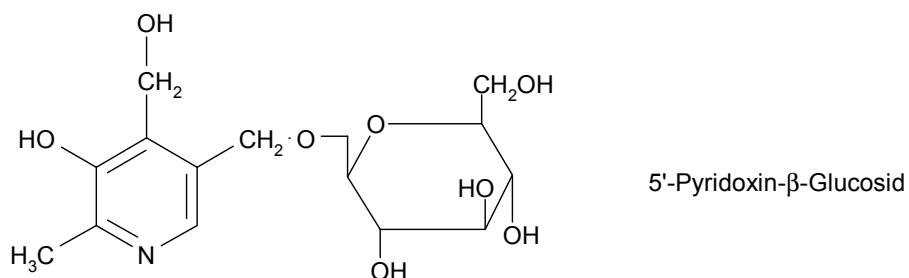
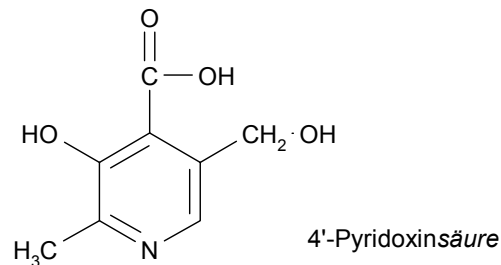
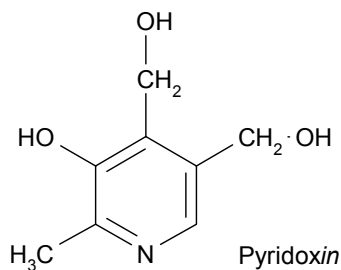
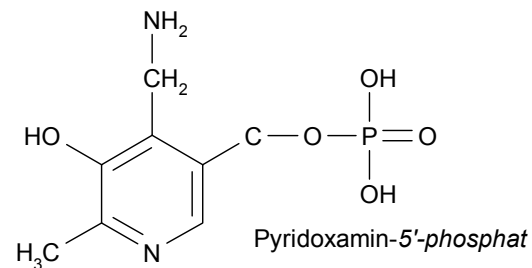
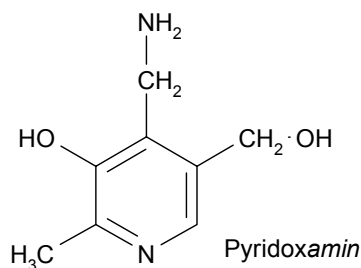
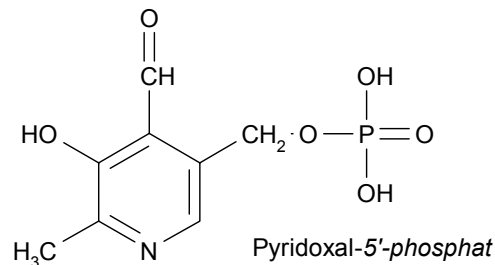
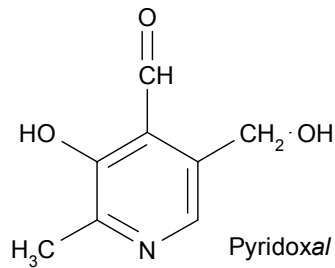


Abbildung 1: Struktur der wichtigsten Pyridoxin-Derivate

Die vitaminaktive Form ist das Pyridoxal-5'-phosphat (PLP), im Organismus können weitere Vitamere in PLP umgewandelt werden: Pyridoxal (PL), Pyridoxin (PN), Pyridoxin-5'-phosphat (PNP), Pyridoxamin (PM) und Pyridoxamin-5'-phosphat (PMP). Gemeinhin werden alle sechs genannten Vitamere als gleich

wirksam betrachtet [45]. Darüber hinaus sind noch weitere Vitamere geringerer Aktivität gefunden worden, deren Struktur in einigen Fällen noch nicht geklärt werden konnte [13].

Die ebenfalls abgebildete 4'-Pyridoxinsäure (PA) ist der wichtigste Metabolit und spielt daher eine Rolle bei analytischen und kinetischen Fragestellungen. Die Höhe der PA-Ausscheidung wird nach Simon 1982 nur durch den Vitamin B6-Versorgungsstatus, aber nicht durch andere Faktoren, wie z.B. das Lebensalter, beeinflusst (vgl. Shane 1970²) [45,80]. Das häufigste in Lebensmitteln vorkommende gebundene Derivat ist das Pyridoxin-5'- β -Glucosid (PNG, siehe Abschnitt 2.1).

Mensch und Tier resorbieren PL, PN und PM etwa gleichermassen, die phosphorylierten Formen sind nur schwer membrangängig. An der Ratte konnte gezeigt werden, dass die Resorption im oberen Jejunum erfolgt. Die gegebenenfalls dephosphorylierten Vitamere diffundieren entlang des Konzentrationsgradienten durch die Zellmembran und werden dann durch Phosphorylierung mittels Pyridoxal-Kinase in der Mucosazelle gebunden. Für die passive Diffusion konnte keine Sättigungsgrenze festgestellt werden [32,45,80].

Noch in der Mucosazelle wird nahezu das gesamte Vitamin B6 zu PLP oxidiert und schliesslich durch alkalische Phosphatase zur membrangängigen Transportform PL hydrolysiert. Nach Aufnahme in die Zelle des Zielorganes wird rephosphoryliert. Dieser Schritt ("metabolic trapping") kann über die Steuerung der notwendigen Pyridoxal-Kinase als bestimmend für die Menge des aufgenommenen Vitamin B6 angesehen werden. Von der Leber wird der Vitamin B6-Spiegel des Blutplasmas und damit auch der Bedarf der peripheren Gewebe gedeckt. Für die Leber konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivität der Pyridoxal-Kinase mehr als 10fach über der Aktivität der Phosphatase liegt. Etwa 20% des Vitamin B6-Vorrats sind in den Mitochondrien lokalisiert. 90% des Vitamin B6 in den Zellen ist an (Apo-)Proteine gebunden und wird relativ langsamer verstoffwechselt als die 10% des ersten Kompartiments. Aufgrund der unvollständigen Vitamin B6-Analytik schwanken die Angaben über den B6-Pool des Menschen stark (40 - 150 mg) [45,80,130].

² Shane-B, PhD Thesis (U London); zit. nach: Simon 1982 (Originalquelle nicht mehr verfügbar.)

2.1. Bioverfügbarkeit des B6

In pflanzlichen Lebensmitteln liegt ein Teil des Pyridoxins in gebundener Form vor, hierbei handelt es sich überwiegend um beta-Glucoside. Weiterhin werden alpha-Glucoside und Phosphopyridoxyl-Lysin beschrieben [147]. Im Tierversuch bzw. im in-vitro Experiment zeigten alpha-Glucoside eine dem freien Pyridoxin vergleichbare Verfügbarkeit, während Phosphopyridoxyl-Lysin als wenig verfügbar gilt. Zur Bioverfügbarkeit von Pyridoxin-beta-Glucosid³ (PNG) für den Menschen liegen wenige und zum Teil widersprüchliche Aussagen vor, jedoch wird PNG überwiegend als für den Mensch nur wenig verfügbar angesehen. Trumbo 1990 beschreibt zwei beta-Glucosidasen in Säugerzellen, zytosolische und spezifischere lysosomale. In humanem Gewebe (intestinale Mucosazellen) wurde mittels Radioisotopen und HPLC-Untersuchung (Methode Gregory) eine geringe Glucosidase-Aktivität festgestellt [52,53,56,59,139].

In einem Review berichtet Reynolds 1988 einen Glucosid-Anteil in Karotten bis 75%, in Blumenkohl von 63 bis 82%. Bei laktierenden Frauen unterschiedlicher Populationen: US-amerikanische Mischköstlerinnen (geringer Glucosid-Anteil in der Kost, $n=4$) und nepalesische Vegetarierinnen (höherer Glucosid-Anteil, $n=26$) werden trotz geringerer alimentärer Gesamt-Zufuhr in der USA-Gruppe höhere Plasma-PLP-Spiegel beobachtet, jedoch in der Milch nur geringe Unterschiede gefunden. Diesen Ergebnissen gegenüber steht die Untersuchung von Morrison 1985, in der eine signifikant positive Relation zwischen dem Versorgungsstatus der Mutter und dem Vitamin B6-Gehalt der Milch ermittelt wurde. Dabei kam jedoch nur für die Milchanalytik ein HPLC-Verfahren zur Anwendung [97,110].

2.2. Analytische Methoden

Für die Quantifizierung von Vitamin B6 stehen mehrere Verfahren zur Auswahl: biologisch-deduktive, biochemische und physikalisch-chemische.

Die biologischen Verfahren beruhten ursprünglich auf der kontrollierten Applikation Vitamin B6-haltiger Substanzen bei ansonsten B6-frei ernährten Tieren (Ratten). Die kleinste Menge (7,5 µg Pyridoxin-Hydrochlorid), die gerade die Rattenakrodynie, ein häufiges Vitamin B6-Mangelsymptom, heilt, wurde als "Ratteneinheit" bezeichnet. Der nächste Entwicklungsschritt war die Verwendung von Mikroorganismen. Mit den mikrobiologischen Methoden lassen sich

³ 5'-O-(β-glucopyranosyl) PN

PN, PL und PM etwa gleich gut bestimmen. Die phosphorylierten Formen werden jedoch meistens nicht erfasst, so dass vor der Analyse dephosphoryliert werden muss. Durch diese Hydrolyse und durch möglicherweise in den Untersuchungsmaterialien vorhandene antimikrobielle Faktoren ist das Wachstum von Mikroorganismen ein eher unpräzises Mass für den Gehalt an Vitamin B6. Wesentlich genauer sind Immunoassays, die aber für Sereinmessungen weniger geeignet sind, sowie die nachfolgend aufgezählten Methoden [45,80]:

Das Wirkprinzip der enzymatischen Verfahren beruht auf der Tatsache, dass die Umsatzgeschwindigkeit bestimmter B6-abhängiger Enzyme (bei Enzym- und Substratüberschuss) nur von der B6-Konzentration abhängt. Die genauesten Methoden zur mengenmässigen Bestimmung des Vitamin B6 benutzen auf physikochemischen Verfahren: Für die Photometrie kann z.B. mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid ein Farbkomplex im sichtbaren Lichtbereich gebildet werden; für die Fluorometrie werden z.B. mit KMnO_4 die Vitamere über PA zum im Alkalischen stark fluoreszierenden Pyridoxolacton oxidiert. Der Nachteil bei der Verfahren ist die alleinige Eignung für nahezu reine Substanzen.

Das älteste chromatografische Verfahren (1964) zur Bestimmung von Vitamin B6 in heterogenen Matrices ist die halbquantitative Papierchromatografie nach Hakanson [60], bei der die aufgetrennten Vitamere mit der Semicarbazid-Methode unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Der Nachteil ist die Beschränkung auf PL und PLP, die ausserdem wegen der überlagerten Fluoreszenzen voneinander getrennt bestimmt werden müssen.

Die Entwicklung der B6-Analytik ging über Säulenchromatografie hin zur Hochleistungsflüssigchromatografie (HPLC) auf Umkehrphasenmaterial, bei der die stationäre Phase (Silikate mit eingelagerten Alkylseitenketten, meist C_8 bis C_{18}) von einer relativ polareren mobilen Phase unter hohem Druck durchströmt wird. Da die einzelnen Vitamere durch ihre Seitenketten unterschiedlich polar sind, wird die HPLC-Säule verschieden schnell passiert, somit stehen die Vitamere zeitlich getrennt im Fliessmittelstrom einer fluorometrischen oder sonstigen Detektion zur Verfügung. Leider erreicht keine bis heute beschriebene Methode vollständig diesen Idealzustand, auch ist häufig der apparative Aufwand so hoch, dass der Nutzen nicht mehr in akzeptablem Verhältnis zu den eingesetzten Mitteln steht [45,51,55,80,98,150].

2.2.1. Methoden nach Vanderslice 1979 und Coburn 1983

Die ältesten HPLC-Methoden benutzten entweder Kationen- oder Anionentauscher mit anschliessender UV-Detektion und konnten zunächst nur für einzelne Vitamere mit wechselhaftem Erfolg eingesetzt werden. 1983, mehr als zehn Jahre nach den ersten HPLC-Analysen von B6-Vitaminen, stellten Coburn et al. [26] eine erste praktikable Kationenaustausch-Chromatografie zur genauen Bestimmung aller sieben B6-Formen (6 Vitamere und PA) vor. Das nach heutigen Massstäben sehr hoch konzentrierte Fließmittel wurde über einen aufwendigen Gradienten aus drei verschiedenen Lösungsmitteln angesteuert. Der wesentliche Entwicklungsschritt der Methode Coburn war jedoch die Verlagerung der Derivatisierung hinter die Trennsäule. Damit konnte das Derivatisierungsmittel in neutraler bzw. alkalischer Lösung (Natriumhydrogensulfit, Reaktion mit der 4'-Aldehydgruppe des PLP) die Detektierbarkeit der Vitamere verbessern, ohne deren Auftrennung in der analytischen Säule, für die ein saures, pH-stabiles Milieu erforderlich ist, zu behindern. Die Derivatisierung mit Hydrogensulfit begünstigt Störsubstanzen weit weniger als die bis dahin vorherrschenden Verfahren mit Semicarbazid oder Bromcyan. Nach verschiedenen Weiterentwicklungen (s.u.) zeigt die Methode Coburn gute Ergebnisse sowohl in Plasma, in Geweben als auch in Lebensmitteln. Die Nachteile liegen in dem hohen apparativen Aufwand (ternärer Gradient), der Wartungsintensität (hohe Pufferkonzentrationen mit Gefahr der Auskristallisation) und den langen Laufzeiten (50 Minuten).

Lui et al. 1985 [83] verglichen die von Coburn et al. 1983 [26] vorgestellte HPLC-Methode mit anderen, damals üblichen Bestimmungsverfahren anhand von Blutproben von neun Probanden und stellte eine generelle Überlegenheit der HPLC-Technik fest. Einschränkungen ergaben sich lediglich durch eine potenzielle Überschätzung der Plasmawerte von Pyridoxinsäure sowie durch die zum damaligen Zeitpunkt noch nicht ausreichende Peaktrennung in Urinproben. Shephard et al. 1989 [127] untersuchten mit einer ebenfalls auf Coburn et al. 1983 [26] basierenden HPLC-Technik u.a. die Vitamer-Spiegel in Humanplasma und -erythrozyten von zehn Probanden. Mit der damaligen Technik konnten nicht alle Vitamere quantitativ erfasst werden, die Autoren postulierten jedoch Proteinbindungen als stabilisierend für phosphorylierte Vitamere.

Die Anionentausch-Chromatografie konnte schon 1979 alle sieben Vitamere in einem einzigen Analysendurchgang detektieren, zudem verlief die von Vanderslice et al. [155] vorgestellte und weiterentwickelte Methode isokratisch; dennoch waren die Anforderungen an die Geräteausstattung noch höher: Im Sys-

tem waren zwei verschieden temperierte Trennsäulen, zwei Detektoren und ein abgestufter pH-Wert des Fliessmittels zwischen 2,5 und 10. Die mehr als eine Stunde dauernde Analyse konnte die Vitamere in Lebensmitteln und in Plasma bestimmen. In den letzten Entwicklungsstufen wurde PA nicht mehr erfasst, damit war die Methode für kinetische Fragestellungen nicht mehr sinnvoll. Die späteren Methoden benutzen Umkehrphasen-Trennsäulen (reversed-phase, RP) zur Auftrennung der Vitamere.

2.2.2. Methoden nach Gregory 1978

Aufbauend auf den von Horvath 1976 vorgestellten Grundlagenarbeiten entwickelten Gregory et al. [51-59] ab 1978 ein HPLC-Verfahren zur Bestimmung von PN, PL und PM, die phosphorylierten Formen wurden nicht erfasst. Die Eckwerte der Methode waren bereits den heute noch Üblichen sehr ähnlich, mit einem stark sauer (pH 2,2) eingestellten Phosphatpuffer wurden die Vitamere über eine RP-18 Säule getrennt und fluorometrisch detektiert. In späteren Entwicklungsstufen konnte auch PA und PLP (Semicarbazid-Derivatisierung) bestimmt werden, die Methode blieb jedoch im wesentlichen auf Lebensmittel- und Urinproben beschränkt. In den folgenden Jahren wurde die frühe Methode Gregory verschiedentlich an spezielle Untersuchungsbedürfnisse angepasst (z.B. O'Reilly et al. 1980 [105]), eine entscheidende Verbesserung wurde jedoch nicht erzielt. Durch die Rückkehr zur weniger leistungsfähigen UV-Detektion waren die modifizierten Methoden tendenziell noch weniger für die Untersuchung von biologischen Matrices geeignet.

Einen weiteren Schritt in Richtung Detektion aller sieben Vitamere machte Bogner 1985 [15], in dem er die phosphorylierten Vitamere einer Säurehydrolyse unterzog und so als Zunahmen der jeweiligen unphosphorylierten Formen (fluorometrisch) quantifizieren konnte. Die Methode hatte aber noch einige Nachteile: Grundsätzlich sind bei einer Hydrolyse doppelte Analysengänge (vor - nach Freisetzung) erforderlich, aus der Zunahme der unphosphorylierten Vitamere können die Phosphat-Formen errechnet werden. Durch die Verwendung von verdünnter, ungepufferter Schwefelsäure (ca. 0,1 n) als Fliessmittel auf einer C₁₈-Säule dürfte die Handhabbarkeit und Reproduzierbarkeit der Methode heutigen Ansprüchen nicht mehr genügen. Bogner et al. stellten 1997 [16] eine Weiterentwicklung der Methode vor, die ab 1999 von Ollilainen erneut modifiziert und in Reihenuntersuchungen eingesetzt wurde [107]: Phosphatpuffer (33 mmol/l, pH 2,2) mit Octansulfonsäure und Propanolgradient, gekoppelt mit Nachsäulenderivatisierung (Bisulfit). Die Probenaufbereitung (Perchlorsäure)

erfolgte in Anlehnung an Bitsch-R und Möller 1989 [14], d.h. die Messungen (Fluoreszenz; 300/400 nm) wurden dreistufig durchgeführt: 1) Native Probe zur Bestimmung von PN, PL, PM und PA; 2) Dephosphorylierte Probe als Differenzbestimmung von PLP und PMP; 3) Deglykosylierte Probe als Differenzbestimmung von PNG. Auf die letztgenannte Veröffentlichung wird noch in einem folgenden Abschnitt weiter eingegangen.

2.2.3. Methoden nach Tsuge 1986

Mit der Methode von Tsuge et al. [147-150] wurde 1986 die erste Trennung aller sieben B6-Formen beschrieben, die prinzipiell auch heute noch eingesetzt wird. In der letzten Entwicklungsstufe (seit 1994) kommt Phosphatpuffer (pH 3,5) mit einem 0,1 M Natriumperchlorat-Anteil und 1% Acetonitril über einer C₁₈-Säule zum Einsatz. Der grosse Nachteil ist neben der Detektion bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen (305 und 320 nm) die sehr aufwendige Aufbereitung der Untersuchungssubstanzen (Derivatisierung und mehrstündige 50°C-Inkubation mit KCN), wodurch die Effizienz eines routinemässigen Einsatzes in Frage gestellt wird. In einer früheren Anwendung der Methode Tsuge (Hirose et al. 1990, n=7 [67]) wurde nur für PLP eine Derivatisierung vorgenommen, die weiteren Vitamere wurden im Nüchtenplasma in vergleichsweise geringen Mengen oder gar nicht gefunden.

Toukairin-Oda et al. 1989 [138] untersuchte basierend auf Tsuge et al. 1986 [150] einige Lebensmittel und Plasma auf ihren Gehalt an sieben B6-Formen. Die u.a. durch die vergleichsweise lange HPLC-Analysendauer (ca. 80 Minuten pro Mess-/Spülzyklus) gute Peakauftrennung konnte jedoch nicht den gravierenden Nachteil einer schlechten Erfassung von PLP, der Plasma-Hauptform, aufwiegen. Die verwendete Kaliumcyanid-Derivatisierung erwies sich als nicht ausreichend.

2.2.4. Methoden nach Williams 1979

In der Methode von Williams et al. 1979 [158] erstmals eingesetzt wurde ein Ionenpaarreagenz zur gezielten Unterdrückung der Ladungen der Vitamere, zum Beispiel am Stickstoff des Pyridin-Ringes oder an der Aminogruppen des Pyridoxamins. Bei der Ionenpaarchromatografie lagert sich eine geeignete Substanz an die geladenen Gruppen der zu analysierenden Substanz an, so dass im Ergebnis ein grösseres unpolares Molekül von den RP-Säulen länger retiniert werden kann, dadurch verschieben sich die Retentionszeiten der einzelnen Vitamere. Anfänglich wurde Heptansulfonsäure als Reagenz verwendet, später

wurden verschiedene andere Stoffe beschrieben, für die B6-Bestimmung konnte sich letztendlich die Octan-1-sulfonsäure durchsetzen.

In den Untersuchungen von Williams und der Fortentwicklung von Morita et al. 1980 [97] konnten erst einzelne oder mehrere, aber nicht alle Vitamere ermittelt werden, dies gelang erst Tryfiates et al. in ihrer Arbeit von 1982 [146]. Die Methoden waren wegen der verwendeten UV-Detektion jedoch nicht universell einsetzbar [144]. In der von Feldstein und Gregory 1984 vorgestellten Modifikation der Methode Tryfiates (*vgl. übernächsten Abschnitt*) kam dann die leistungsfähigere Fluoreszenz-Detektion neben einem Fließmittelgradienten mit Heptan- und Octansulfonsäure zur Anwendung. Damit stand eine Methode zur standardmässigen Untersuchung von biologischen Matrices zur Verfügung, die Nachweisgrenze lag jedoch noch in mikromolaren Größenordnungen [57].

2.2.5. Methoden nach Pierotti 1984

Die Bestimmung der Vitamere mit der Methode nach Pierotti et al. und den Modifikationen von Morrison et al. 1985 und Hefferan et al. 1986 beruhte wieder auf der Dephosphorylierung von PLP, PMP und PNP, jedoch nicht durch Säurehydrolyse, sondern durch Wärmeeinwirkung (5h bei 120°C und 1.040 HPa Druck). Eine Untersuchung von Humanplasma erfolgte mit einer ähnlichen Methode 1991 durch Chrisley, die sich jedoch nicht durchsetzen konnte. [24,63,97,108]

2.2.6. Methoden nach Gregory 1985

Die von Gregory et al.[55] 1985 vorgestellte Methode übertrug die von Coburn et al. 1983 beschriebene Technik der Nachsäulenderivatisierung auf die reversed-phase-Chromatografie und stellte damit für die nächsten zehn Jahre die Grundlage der chromatografischen Bestimmungen von Vitamin B6 dar; fast alle danach neu vorgestellten Methoden basierten auf diesen Arbeiten von Gregory und modifizierten entweder die Methodenparameter für spezielle Untersuchungen oder verbesserten in Details die Arbeitsabläufe. In den ersten Versionen wurde eine isokratische Elution mit einem stark sauren (pH 2,0) Phosphatpuffer von einer C₁₈-Säule mit anschliessender Derivatisierung durch alkalische Semicarbazid-Lösung und Fluoreszenz-Detektion durchgeführt. Dies erzielte nach Darstellung der Autoren zunächst nur für PL, PLP und PA gute Ergebnisse, erst mit den späteren Modifikationen (Wiedereinführung des Lösungsmittelgradienten) konnte das Verfahren universell eingesetzt werden.

Eine solche Weiterentwicklung wurde von Sampson et al. 1989 [113,114] präsentiert: Durch zwei Fließmittel (jeweils Phosphatpuffer, pH 2,2; zunächst mit Octansulfonsäure, danach mit 10% Propanolanteil) und Nachsäulenderivatisierung mit Hydrogensulfit konnten unter anderem Gewebeproben von Ratten auf

5 sechs Vitamere untersucht werden. Bei diesen und allen folgenden Arbeiten ergab sich jedoch die Schwierigkeit, dass ein PNP-Standard kommerziell nicht mehr verfügbar war und ist, somit konnte im Rahmen normaler Laborarbeit eine Bestimmung von PNP nicht mehr erfolgen. In den letzten Jahren gab es zeitweilig zusätzliche Probleme bei der Beschaffung von PMP.

10 Eine andere Modifikation führte Hollins bereits drei Jahre vorher durch [68]: Unter Verwendung eines Gradienten (Essigsäure zunächst mit Octansulfonsäure, danach mit 20% Acetonitrilanteil), Nachsäulenderivatisierung mit Hydrogensulfit und enzymatischer Dephosphorylierung aller sieben B6-Formen in Plasma (n=10). Die Nachweisgrenze (ca. 5 nmol/l) lag jedoch für einige Vitamere, z.B.

15 PMP, noch oberhalb der physiologischen Nüchternkonzentrationen. Schliesslich setzte Mahruen 1990 eine vergleichbare Technik mit einem ternären Gradienten ein (salzsaures Wasser vs. Phosphatpuffer mit pH-Wert 3,3 bzw. 5,9). Einem routinemässigen Einsatz dieser Methodik standen jedoch Probleme mit Matrix-peaks entgegen. Sharma et al. 1992 [123] stellten unter Verwendung von Gradientenelution und Nachsäulenderivatisierung mit Natriumbisulfit (alle Vitamere

20 ausser PNP erfasst) an acht Probanden bei vergleichbaren <Vitamin B6+PA> ein deutlich von anderen Autoren verschiedenes Vitamerspektrum fest und begründet dies mit seiner auf niedrige Plasmaspiegel optimierten Methode. Van Schoonhoven et al. 1994 [154] verglichen eine HPLC-Methode mit Nachsäulenderivatisierung (modifiziert nach Gregory) und offline-

25 Dephosphorylierung (Taka-Diastase) mit klassischer mikrobiologischer Bestimmung und fand dabei durchweg höhere B6-Werte in Lebensmitteln, wenngleich durch die Dephosphorylierung Aussagen zum Vitamerspektrum nur begrenzt getroffen werden können.

30 **2.2.7. Methoden nach Bitsch und Möller 1990**

Die Modifikationen von Bitsch-R und Möller (1989) [14] verbesserten die Anwendbarkeit des binären Fließmittelgradienten (Methanol vs. Phosphatpuffer mit Octansulfonsäure) unter Beibehaltung der Bisulfit-Nachsäulenderivatisierung zur Fluoreszenz-Detektion der Vitamere. Die Methode wurde mit identischen

35 Parametern von Möller 1990 schwerpunktmässig für Lebensmittel, von Speitling 1991 speziell für Urin und Plasmauntersuchungen durchgeführt [90,131].

Schramm et al. 1993 [119] untersuchten mit der HPLC-Methode nach Möller 1990 und Enzyminkubation sowie NMR eine Reihe von Lebensmitteln auf ihren Gehalt an PN- β -glucosiden. Die Autoren fanden neben 5'- β -Glucosid auch Anzeichen für weitere Vitamin B6-Glucoside.

5 2.2.8. Methoden nach Edwards 1989 und Kimura 1996

Die von Edwards et al. 1989 [38] beschriebene und von Kimura et al. 1996 [74] weiterentwickelte Methode zur Bestimmung der B6-Vitameren benutzte ein anspruchsvoll zusammengesetztes Fließmittel für eine isokratische Elution. Bei der Methode Edwards bestand das Fließmittel aus jeweils 75 mmol NaH_2PO_4 und NaClO_4 , 8,5 ml Acetonitril und 0,5 ml Triethanolamin, bezogen auf 1 Liter, pH-Einstellung auf 3,38 mit HClO_4 . Es wurde noch eine Nachsäulenderivatisierung mit Hydrogensulfit durchgeführt, für die Untersuchung von PA wurde die Zusammensetzung des Fließmittels verändert, so dass die Bestimmung nicht im gleichen Analysengang erfolgen konnte. Eine kürzliche erfolgte Anwendung dieser Methode (Hiraoka et al. 2001 [66]) zur Bestimmung der Nüchternplasmawerte von 150 Probandinnen ist in Abschnitt 5.1.1 angeführt.

Kimura et al. perfektionierten die Methode ab 1995 dann soweit, dass die aufwändige Nachsäulenderivatisierung nicht mehr erforderlich war, die Einzelheiten der Methode Kimura werden im folgenden Kapitel ausführlich dargestellt (vgl. Tabelle 3).

2.2.9. weitere HPLC-Verfahren

Torres-Sequeiros et al. 2001 [137] stellten eine beschleunigte HPLC-Methode (Mess-/Spülzyklus 28 min) zur Untersuchung vitaminisierter Getränke vor, die jedoch ausschliesslich auf die Erfassung von Pyridoxin ausgelegt ist. Moreno et al. 2000 [96] beschreibt eine auf die Untersuchung von Multivitaminmischungen spezialisierte HPLC-Methode mit NH_4 -Acetat/Methanol-Gradient und UV-Detektion (270 nm). Diese schnelle und elegante Methode scheint für die in Präparaten vorhandenen Konzentrationen sehr gut geeignet, ist jedoch mit einer Nachweisgrenze von mehr als 6 $\mu\text{mol/l}$ für physiologische Konzentrationen nicht anwendbar. Auch hier wurde von den Autoren "Vitamin B6" mit Pyridoxin-Hydrochlorid gleichgesetzt.

35 Dinc et al. 2000 [33,34] verglichen spektrophotometrische und HPLC-Bestimmung von Thiamin- und Pyridoxin-Hydrochlorid in pharmazeutischen Zubereitungen. Die Autoren befanden die HPLC-Technik als für ihre Zielvorgaben

zu aufwändig. Auffallend an der beschriebenen, eher schlichten Methode ist die ungewöhnlich kurze Retentionszeit von unter zwei Minuten für PN-HCl. Eine ähnliche HPLC-Technik zur gleichzeitigen Bestimmung von vier B-Vitaminen in Magensaft-Proben tierischer Herkunft benutzten Chhabra 1999 [23]. Auch hier fällt eine kurze Retentionszeit (2,5 Minuten) auf und die alleinige Bestimmung von PN, obwohl biologische Matrices untersucht werden.

Ein Vorläufer dieser Technik war die Analyse von Canella et al. 1983 [20] (HPLC-Bestimmung von 6 B-Vitaminen), die durch einen für eine isokratische Methode hohen Methanolanteil (32%) und gering konzentrierten Phosphatpuffer (ca. 10 mmol/l in der fertigen Lösung) sehr kurze Analysenzeiten realisieren konnte (PN-HCl eluiert nach ca. 3 Minuten). Die untere Bestimmungsgrenze für Pyridoxin von 390 µmol/l liegt jedoch weit oberhalb jeglicher physiologischer Konzentration, ähnliches gilt für die Untersuchung von Amin et al. 1987 [2]. Eine weitere isokratische HPLC-Methode zur Erfassung mehrerer B-Vitamine, die besser an physiologische Konzentrationen angepasst war, stellten Böttcher et al. 1987 [18] vor, hier waren auch getrennte Bestimmungen der nicht-phosphorylierten Vitamere möglich. Gauch et al. 1992 [47] führten im Rahmen einer auf die Untersuchung von (Kuh-)Milch optimierten Gradientenelution eine zusätzliche Veränderung der Flussrate während der Analyse ein, um die Gesamtmessdauer zu verkürzen. Hierbei erfolgt die Messung nach Totalhydrolyse der Probe, so dass nicht zwischen freien und konjugierten Vitameren unterschieden wird.

Argoudelis 1988 entwickelte eine isokratische HPLC-Methode zur Erfassung der sechs Vitamere, die in leicht modifizierter Form und mit Nachsäulenderivatisierung 1997 zusätzlich auch Pyridoxinsäure erfasste und eine sehr gute Trennung der Peaks in biologischen Matrices ermöglicht, jedoch wurde auch noch in seinen späteren Publikation die Anwendung für physiologische Konzentrationen stark in Frage gestellt [5-7].

2.2.10. Nicht-HPLC Bestimmungen

Die Bestimmung von Vitamin B6 über die Massenspektrometrie (MS) hat sich für Serienmessungen nicht durchsetzen können, häufig bedingt durch die eher unpräzisen quantitativen MS-Verfahren, die hier nicht weiter erläutert werden sollen. Lediglich der Einsatz von (stabilen) Isotopen, wie er von der Arbeitsgruppe um JF Gregory⁴ praktiziert wird, ist von einiger Bedeutung⁵. Die von

- Gregory et al. [51 ff.] durchgeführten in-vivo Untersuchungen mit Deuterium-markiertem PN (Reinsubstanz) bzw. PNG mit unphysiologischen Applikationsformen, z.B. i.v., belegen für den Menschen eine bessere Verfügbarkeit von PNG als aus dem Tiermodell zu erwarten wäre, dies wird u.a. mit Enzymaktivitäten der Darmmucosa begründet [59]. Dennoch konnte auch hier nicht die Frage nach der Bedeutung dieser Aussagen für native Lebensmittel geklärt werden.

2.3. biokinetische Untersuchungen

- 10 Dieser Abschnitt stellt unter Beschränkung auf nicht-invasive Techniken häufiger zitierte in-vivo Versuche zur Ermittlung der Bioverfügbarkeit des Vitamin B6 vor:

- Wozenski** et al. 1980 [159] verabreichten fünf Männern ($27,2 \pm 3$ Jahre, BMI⁶ $23,7 \pm 2,1$) an unabhängigen Versuchstagen sechs Pyridoxin-Hydrochlorid (PN-HCl) Dosen zwischen 0 und 10 mg ($48,6 \mu\text{mol}$) bzw. $19,5 \mu\text{mol}$ PM⁷ oder PL⁸. Die Bestimmung von Plasma-PLP und Plasma-B6 (Methode: *Saccharomyces uvarum*) ergab einen deutlichen Anstieg⁹ erst für PN-HCl Dosen von 1 mg und mehr. Bei den physiologischen Dosierungen waren nach 3 bzw. 4 Stunden die Ausgangswerte von Plasma-B6 wieder nahezu erreicht, während die PLP-Werte noch leicht erhöht waren. Ein weiterer Abfall konnte nicht beobachtet werden, da die Probanden nicht nüchtern blieben. Aus dem gleichem Grund sind die Urinexkretionen nur für die ersten Stunden aussagekräftig. Hier zeigte der Anteil der vitaminwirksamen B6-Formen an der Gesamtausscheidung ein im Wesentlichen proportionales Verhalten zur applizierten Dosis. Bei den physiologischen Dosierungen wurden etwa 60 % der applizierten Dosis im Urin wiedergefunden (einschl. Pyridoxinsäure). Nach Verabreichung von PL erfolgte ein etwas stärkerer Anstieg der Plasmaspiegel und eine etwas höhere Urinausscheidung, während die Werte nach PM-Zufuhr etwas niedriger lagen (nur teilweise signifikant).

⁴ Univ. of FL, Gainesville, Florida, USA

⁵ Messung (Quantifizierung) der B6-Formen mit HPLC-Methode, Isotopenbestimmung (z.T. nur halbquantitativ) mit GCMS

⁶ Eigene Berechnung aus den veröffentlichten Daten

⁷ verabreichte Form 5,04 mg PM-Dihydrochlorid-Monohydrat

⁸ verabreichte Form 3,96 mg PL Hydrochlorid

⁹ mehr als 10 nmol/l für PLP bzw. 20 nmol/l Plasma-B6

Ubbink et al. 1987 [151] untersuchte mit einer selbst entwickelten HPLC-Methode an 9 Probandinnen therapeutische Dosierungen von Pyridoxinhydrochlorid (10-100 mg, ca. 50-500 µmol). Die ermittelten Dosis-Wirkungs-Beziehungen wurden von den Autoren ausdrücklich nicht auf physiologische Dosierungen übertragen. Einen ähnlichen Ansatz verfolgten **Thakker** et al. 1987 [136], in dieser Studie wurden an zwölf Probanden pharmazeutische Vitaminpräparate (5-8 mg PN-HCl) untersucht, die Messwerte beschränkten sich jedoch auf PL und PLP im Plasma und die kinetischen Daten sind wenig auf andere Fragestellungen übertragbar, da z.T. Gelkapseln (soft elastic gelatin, SEG) mit verzögerter Freisetzung appliziert worden sind.

Maschner 1993 [90] untersuchte mittels HPLC-Verfahren mit Nachsäulenderivatisierung (Semicarbazid-Methode ähnlich Gregory) und unter Beschränkung auf die Bestimmung von PL (PLP dephosphoryliert), ob ein zirkadianer Rhythmus des Plasma-Vitamin B6 auftrat und die Plasmaspiegel von 16 Probanden nach Applikation von 40 mg PN-HCl (Vitaminpräparat p.o.). Hierbei wurde die maximale Plasmakonzentration nach 1,25 bis 1,4 Stunden erreicht.

In einer hochdosierten kinetischen Studie (**Speitling** 1991 [131], 400fache Tagesdosis, oral zugeführt) mit neun Probanden wurde eine einphasige PN-Elimination aus dem Plasma ermittelt, andere B6-Formen wurden zweiphasig eliminiert mit einer Adaption an die zugeführte Menge. Die kinetischen Größen der Urinexkretion, wie z.B. die Eliminationskonstanten, wurden nicht durch die Zufuhrmengen beeinflusst und PA bildete die Hauptausscheidungsform für das zugeführte PN.

In der Arbeitsgruppe **Gregory** wurden einige Studien zur Bioverfügbarkeit von gebundenem Vitamin B6 durchgeführt (Analytik siehe Abschnitt 2.2.10.). Hierbei (Gregory et al. 1991 [59]) erhielten fünf bis acht Probanden Testmahlzeiten mit definiertem PN-Gehalt, dem markiertes PN und PNG extrinsisch zugesetzt wurde. Aus den so ermittelten Werten, im wesentlichen der Summenexkretion von PA, wurde eine PNG-Verfügbarkeit von 58 % berechnet, es bleibt aber bei dem gewählten Versuchsansatz offen, inwieweit diese Ergebnisse auch auf "echte" Lebensmittel übertragbar sind, da unklar ist, ob sich das nachträglich zugesetzte PN bzw. PNG tatsächlich genauso verhält wie das lebensmitteleigene PN bzw. PNG.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Bezugsquellen

- MAGV
5 Massanalytische Glas- und Laborgeräte Vertriebsgesellschaft mbH
(//home.t-online.de/home/magv-gmbh)
- Merck
Merck Eurolab GmbH (www.merckeurolab.de)
KMF Laborchemie GmbH (www.kmf1.de)
- 10 • Sauerbrey
R.Sauerbrey Chromatographie
(D34359 Reinhardhagen; r.sauerbrey@t-online.de)
- Sigma, Fluka
Sigma-Aldrich Chemie GmbH (www.sigma-aldrich.com/order)

15 3.1.2. Reagenzien

3.1.2.1. Verbrauchsmaterialien

- beta-Glucosidase from almonds (EC 3.2.1.21) Sigma G4511
- Kaliumdihydrogenphosphat p.a. Merck 1.04873.1000
- Methanol (HPLC-Grad) Merck 1.06008.2504 und Sauerbrey ME03152500
- 20 • Natriumacetat p.a. Merck 1.06267.1000
- Natriumhydrogensulfit (39%) ("bisulfit") Merck 8.06356.1000
- Natriumperchlorat-Monohydrat p.a. Merck 1.06565.0500
- o-Phosphorsäure (85%) p.a. Merck 1.00573.1000
- Trichloressigsäure p.a. Merck 1.00807.1000
- 25 • Wasser, doppelt entmineral. ("bidest")
Aufbereitung mit "MilliQ^{UF}plus"-Anlage (MAGV)

3.1.2.2. Standards

- Deoxypyridoxin Sigma D0501
- Pyridoxal Sigma P9130
- 30 • Pyridoxalphosphat Sigma P9255
- Pyridoxamin Sigma P9380
- Pyridoxaminphosphat Fluka 82890
- Pyridoxin Sigma P9755
- Pyridoxinsäure Sigma P9630

3.1.3.**Geräte**

- Fluoreszenz-Detektoren Merck-Hitachi F1000 und F1050
- HPLC-Kartuschen LiChroCART 250-4 LiChrospher 100RP18 5µm Sauerbrey 50833/983
- 5 • HPLC Systeme Merck-Hitachi 655A-11/L-5000 und L6200A
- Injektorventile Rheodyne 7025
- Integratoren Merck-Hitachi D2000 und D2500
- KABE-Blutcontainer Amm.-Heparin Sauerbrey 071370
- 10 • Kühlzentrifugen RC-2B und RC-5B, Rotoren SS34;
Sorvall Inc. Norwalk UK

3.2. Methodische Arbeiten

- Einige Verfahren zur Methodvalidierung, z.B. Bestimmung von Intraseerien-Schwankungen, sowie die eingesetzten Berechnungen und mathematischen Modelle werden zur Verbesserung der Übersicht nur im Zusammenhang mit den Hauptversuchen beschrieben, obwohl sie auch innerhalb von Vorversuchen durchgeführt wurden.

3.2.1. Analytische Methodik

3.2.1.1. Chromatografische Methode

3.2.1.1.1. Elution

- Die aufbereiteten Proben wurden manuell über eine 50 µl Probenschleife in das HPLC-System injiziert und über eine 250×4 mm LiChrospher 5 µm RP8 Säule mit 4 mm Vorsäule eluiert.

Tabelle 2: Fließmittelzusammensetzung des HPLC-Systems

Eluent	Zusammensetzung	Anmerkung
A	Methanol 66,7% (v/v)	für Spülzyklus zwischen einzelnen Messungen
B	Phosphatpuffer für Messungen, pH 2,80	Vorratslösung mit 133mM Kaliumdihydrogenphosphat und 133mM Natriumperchlorat, durch 40µm Porenfilter filtriert. Ein- bis zweimal je Messtag wurde zur Verbrauchsmenge 2% (v/v) Methanol und 0,25% (v/v) einer 37%igen (w/v) Bisulfit-Lösung (Natriumhydrogensulfit) zugegeben sowie pH-Wert mit H ₃ PO ₄ eingestellt.
C	Methanol 10,0% (v/v)	zur Säulenreinigung
D	Methanol 25,0% (v/v)	im Nachtlaf zwischen Messtagen benutzt. Bei Gradientenformern mit nur drei Zuläufen im Wechsel mit Fliesmittel "B" eingestellt

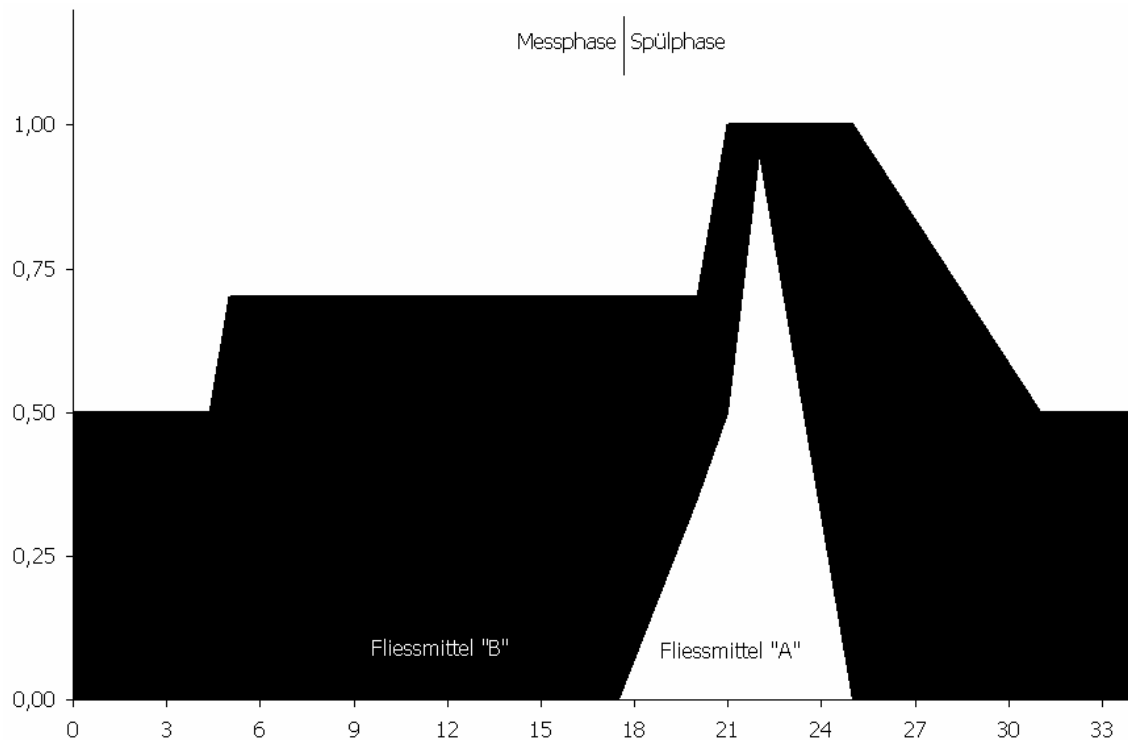
- Alle Fließmittel wurden vor Gebrauch entgast (Ultraschallbad oder Degasser mit He-Strom).

3.2.1.1.2. Pumpensteuerung

Für die Gradientenpumpen wurden vier Steuerungsprofile ausgeführt: "Messzyklus", "Spülzyklus", "Säulenreinigung" und "Nachtlaf".

- Messzyklus:** 100% Fließmittel "B" mit isokratischem Flow 0,5 ml/min für 4 Minuten, dann langsame Erhöhung auf 0,7 ml/min und konstant halten bis 17,5 min - falls letzter ausgewerteter Peak bis dahin erschienen war, andernfalls wurde die isokratische Einstellung solange wie notwendig beibehalten. Hieran wurde immer ein Spülzyklus angeschlossen.

Spülzyklus: Methanolgradient bis auf 63,4%, anschliessend: Erhöhung der Flussrate auf 1,0 ml/min, Zurückregeln von Fließmittel "B" auf 100% und Senken der Flussrate auf 0,5 ml/min (Details siehe Abbildung 2).



5 Abbildung 2: Grafische Darstellung der Pumpensteuerung im Mess- und Spülzyklus. x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Flussrate [ml/min]

Säulenreinigung: Die Säulenreinigung bestand aus mehreren Wasser-/Methanol-Gradienten, gekoppelt mit einem allmählichen Absenken der Flussrate auf 0,1 ml/min, Details siehe Abbildung 3. Sofern ein Messtag mehr als acht

10 Netto-Betriebsstunden (ohne Vor- und Nachreinigung des HPLC-Systems) umfasste, wurde etwa zur Tagesmitte eine zusätzliche Regenerationsphase (Säulenreinigung) durchgeführt.

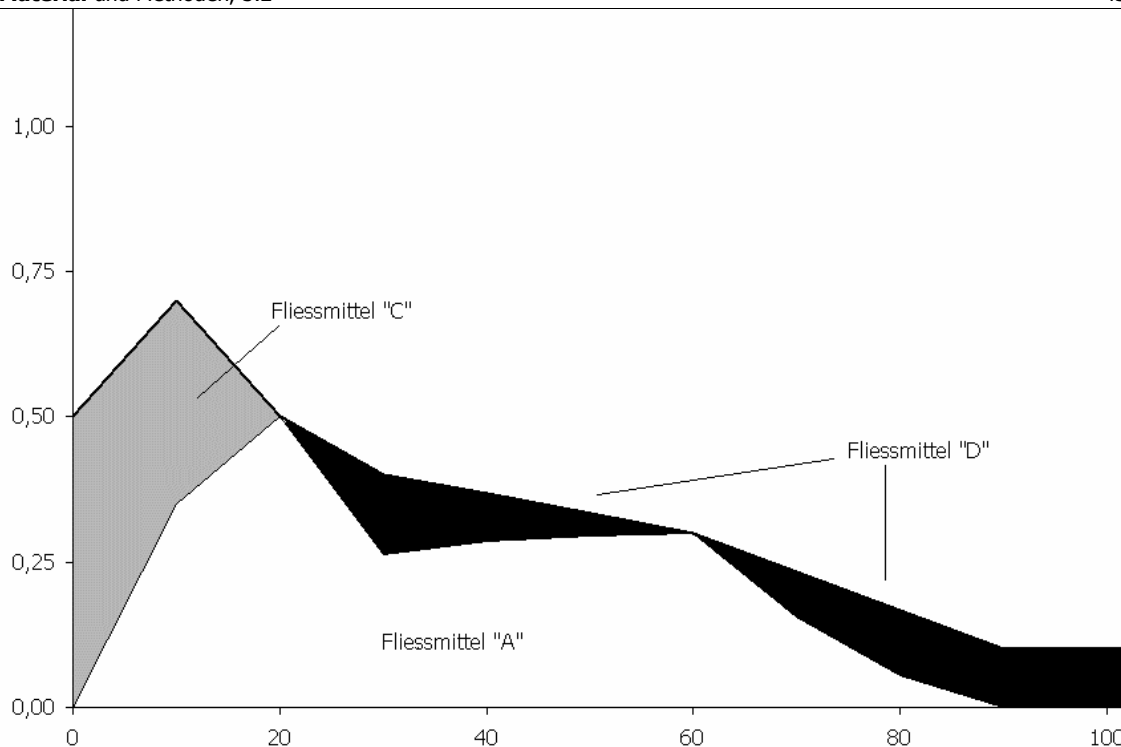


Abbildung 3: Grafische Darstellung der Pumpensteuerung zur Säulenreinigung. x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Flussrate [ml/min]

Die letzte Einstellung aus der Säulenreinigung (100% "D", 0,1 ml/min) wurde
 5 als **Nachlauf** beibehalten bis zum nächsten Messtag. Zu Beginn des neuen
 Messtages wurde die Pumpe mit frischen Eluenten versorgt und die Flussrate
 (100% "B") über 45 min auf 0,5 ml/min gesteigert.

3.2.1.1.3. Detektion

Die Bestimmung der B6-Gehalte erfolgte über Fluoreszenz-Detektion bei den
 10 nominalen Wellenlängen 290 bzw. 400 nm (Ex/Em), dabei waren die verwendeten
 Wellenlängen nicht auf maximale Fluoreszenz, sondern auf möglichst gute
 Erfassung der als kritisch angesehenen B6-Formen hin optimiert (siehe Anhang).
 Falls in sehr komplexen Matrices eine Trennung zwischen den Peaks bis hin zur
 Basislinie ("BB") nicht erreichbar war, wurde in Abhängigkeit zur Peakform eine
 15 einseitige Lotfällung akzeptiert ("BV" bzw. "VB"). Eine zweiseitige Berechnung
 mittels Hilfslinien ("VV") wurde als nicht ausreichend angesehen, auch wenn die
 Integrator-Software noch scheinbar zuverlässige Werte lieferte.

Alle Proben wurden mindestens zweifach gemessen (Hauptversuch: dreifach)
 und ein Mittelwert samt Standardabweichung bestimmt. Die Proben wurden
 20 innerhalb der jeweiligen Messtage nicht linear, sondern nach dem Zufallsprinzip
 angeordnet.

3.2.1.2. Quantifizierung

3.2.1.2.1. Eichung

Die Umrechnung von Fläche unter der Kurve ("Area") nach Konzentration [nmol/l] erfolgte mittels Eichgeraden, die für jede verwendete Kombination von zu detektierender Substanz und Matrix getrennt anhand von fünf (dPN: vier)

5 zu Konzentrationsstufen als Mittelwert aus jeweils fünf Wiederholungsmessungen bestimmt wurden (Zahlenwerte und Berechnungen siehe Anhang).

Anhand der Eichkurven wurde ein linearer Wertebereich festgelegt, innerhalb dessen die Proben ohne zusätzliche Verdünnung (mit Bidest) bzw. Aufkonzentrierung (im Vakuumverdampfer) gemessen werden konnten. Die Festlegung

10 von Nachweis- und Bestimmungsgrenze erfolgte bereits im Rahmen der Vorversuche und ist ebenfalls im Tabellenteil enthalten.

3.2.1.2.2. Umrechnungsfaktoren

Alle Volumenänderungen (z.B. durch Verdünnungen, pH-Einstellung oder Enzymzugabe) wurden für jede Probe individuell erfasst und als Verdünnungsfaktoren innerhalb einer Tabellenkalkulation berücksichtigt

15

Für die Auswertungen wurden die ermittelten Konzentrationen im Urin [nM = nmol/l] noch mit dem je Stunde ausgeschiedenen Urinvolumen [l/h] multipliziert, um Werte in der für kinetische Betrachtungen notwendigen Dimension [nmol/h] zu erhalten.

20

3.2.1.2.3. Identifikation

Die Identifikation der B6-Formen, d.h. die Zuordnung der Peaks, erfolgte primär über die ermittelten Retentionszeiten¹⁰. Dieses Vorgehen wurde mindestens einmal pro Matrix und Messtag mit internen Standards überprüft. Weitere aufgezeichnete Matrix-Peaks standen in keinem Zusammenhang mit B6-Formen oder potentiellen Derivaten.

25

3.2.1.2.4. Stammlösungen

Die 1 mM Stammlösungen (0,1 mM für PA) in H₃PO₄-angesäuertem Bidest waren einige Wochen bei –18°C lagerfähig (jeweils ca. 25 ml Volumen in verschlossenen Braunglasflaschen), die Lagerung bei –80°C erbrachte keine wesentliche Verbesserung der Lagerfähigkeit. Die Standard-Substanzen (kristallin) wurden nach Herstellervorschrift gelagert.

30

¹⁰ Zur Peakidentifikation per MS vgl. Diskussion bzw. Anhang.

3.2.1.3. Validierung

Die Wiederfindungsrate ergab sich durch Anreicherung von Proben zu Beginn der Aufbereitung, d.h. spätestens im jeweiligen Schritt vor TCA-Fällung. Zur Ermittlung von Intra-Serien Schwankungen wurde eine grössere Anzahl von Wiederholungsmessungen über einen Messtag verteilt durchgeführt. Inter-Serien Schwankungen wurden durch wiederholte Messungen vergleichbarer (lagerfähiger) Proben an mehreren Messtagen bestimmt. Auf den Einsatz externer Standards (dPN) wurde bei den kinetischen Versuchen wegen der hohen Retentionszeit verzichtet.

3.2.2. Variationen

Die von Kimura 1996 [74] vorgestellte isokratische HPLC-Methode zur Plasmauntersuchung wurde mit dem Ziel einer universell einsetzbaren Analysenmethode variiert; einige dieser Variationen werden im Folgenden vorgestellt (Werte siehe Anhang).

Tabelle 3 Methodenparameter (HPLC) im Vergleich zu Kimura 1996

Parameter	Kimura	hier:
Fließmittel	100 mmol/l KH_2PO_4 100 mmol/l NaClO_4 500 mg/l NaHSO_3	133 mmol/l KH_2PO_4 133 mmol/l NaClO_4 + 2,5 ml/l 39%ige Lösung von NaHSO_3 2% Methanol (tägl. frischer Ansatz)
pH-Einstellung	3 Einstellung: H_3PO_4 85%	2,80 Einstellung: H_3PO_4 85%
Flussrate	1,0 ml/min konstant	0,5 bis 0,7 ml/min (zeitgesteuert)
Fluoreszenz-Detektion (Anregung / Emission)	300 / 400 nm	290 / 400 nm
Dauer eines Analysenganges	13 min (keine Angaben zur Equilibrierung)	33 min (davon 17,5 min Messphase)
analytische Säule	ODS RP (C18)	Merck RP8, 250 mm
Vorsäule	keine Angabe	Merck RP8, 4 mm

3.2.2.1. Mobile und feste Phase

Neben dem im Vergleich zu Kimura höher konzentrierten Phosphatpuffer mit isomolarem Perchloratanteil und geringer Methanolzugabe wurden auch weitere Laufmittel erprobt. Organischer Anteil: Methanol, Ethanol, Acetonitril und Ethylacetat; anorganische und sonstige Anteile: verschiedene Phosphate und Konzentrationen, Perchlorat-Dosierungen, Ionenpaar-Reagenzien (z.B. Octansulfon-

säure), Säuren (neben H_3PO_4) und Laugen (z.B. KOH) zur Vermeidung von Ausfällungen bzw. zur pH-Einstellung.

Als feste Phasen wurden RP8 und RP18 Packmaterialien als LiChrospher und Superspher-Kartuschen eingesetzt sowie die Vor- und Nachteile verschiedener Säulenvolumina und Korngrößen abgeklärt.

3.2.2.2. Gradientenelution

Der Einsatz von "echten" Gradienten mit verschiedenen Laufmitteln und von Flussratengradienten, d.h. nur ein Laufmittel, aber Steuerung unterschiedlicher Flussraten während der Analyse wurde untersucht. Die Notwendigkeit der Säulenreinigung, der Spülzyklen zwischen den Messungen oder über Nacht ggf. mit Umkehr der Fliessrichtung wurde jeweils auch im praktischen Versuch erfasst.

3.2.2.3. andere chromatografische Parameter

Mit dem Ziel einer monochromatischen Messung wurde ein Wellenbereich von 270-330 nm bzw. 365-435 nm gescannt und resultierend eine Kombination zur Fluoreszenz-Detektion (290/400 nm) ausgewählt. Weitere untersuchte und variierte Methodenparameter waren das Schleifenvolumen im Einspritzventil (20 vs. 50 vs. 100 μl) sowie die Laufzeit der einzelnen Analysen und Anzahl der Wiederholungen zur Erzielung eines Mittelwertes mit hinreichend geringen (Standard-)Abweichungen. Der Einfluss der Temperatur wurde protokolliert und in Form eines zulässigen Anwendungsbereiches in den späteren Messvorschriften berücksichtigt, da eine aktive Temperatursteuerung nicht zur Verfügung stand.

3.2.3. Lebensmittelauswahl

Auf ihre Eignung für die geplanten Versuche wurden untersucht:

- Säfte
 - o Fruchtsäfte (einschl. Mischungen und angereicherte Erzeugnisse)
 - o Gemüsesäfte (Karotten, Tomaten und Mischungen)
- sonstige Lösungen
 - o PN-HCL in Mineralwasser, Leitungswasser und Bidest
 - o Vitamintabletten in Bidest
 - o Injektionslösung (pharmazeutische Zubereitung)
 - o (Schwarzer) Tee (Aufguss und Konzentrat)

- Hülsenfrüchte (ohne Keimlinge)
 - o Linsen und Rote Linsen, Erbsen, Kichererbsen, Bohnen, Soja
 - Kohlgemüse
 - o Blumenkohl und Broccoli (jeweils tiefgekühlt und als "marktfri-
- 5 sche" Ware in verschiedenen Jahreszeiten)
- Sprossen, Keimlinge
 - o Soja, Alfalfa, Mungbohne, Erbssprossen, Kresse, Weizen, Roggen, Sonnenblume

3.2.4. Probenaufbereitung

10 Eine Übersicht der Probenaufbereitung findet sich in Abbildung 4 auf Seite 51.

3.2.4.1. Lebensmittel

3.2.4.1.1. Kohlgemüse

Die tiefgekühlten Gemüse wurden ohne küchentechnische Vorbereitung verwendet. Die marktfrischen Gemüse wurden geputzt, grob zerkleinert und in An-

15 gleichung an die Tiefkühlkost sortiert. Unter Zugabe von 1/3 (Gewicht) Wasser wurde das Gemüse 4 Minuten im Drucktopf gekocht. Dampfverluste wurden auf das Ausgangsgewicht wieder aufgefüllt und das Gemüse unmittelbar anschlies-

20 send mit einem Mixstab fein zerkleinert. Von der homogenisierten Paste wurde eine Probe in Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 10%iger (w/v) TCA¹¹-Lösung im Gewichtsverhältnis 1/1 versetzt und 30 Minuten im Ultraschallbad bei 37°C aufgeschlossen. Die weiteren Aufbereitungsschritte sind im Abschnitt 3.2.4.4 beschrieben.

3.2.4.1.2. andere feste Lebensmittel

Getreidekeime und ähnliche Lebensmittel wurden ohne weitere Wasserzugabe

25 im Mörser zerkleinert, dann mit 10%iger (w/v) TCA-Lösung überführt und aufgefüllt, bis ein Gewichtsverhältnis von 1/1 erreicht wurde. Weiteres Vorgehen siehe Abschnitt 3.2.4.4. Feste Lebensmittel, die eine Zubereitung erfordern, (z.B. Hülsenfrüchte) wurden analog dem Kohlgemüse aufbereitet.

3.2.4.1.3. Getränke und Lösungen

30 Den Getränken bzw. Lösungen wurde je nach erwartetem B6-Gehalt entweder 10%ige (w/v) TCA-Lösung bis zum Volumenverhältnis von 1/1 zugegeben oder

¹¹ Trichloressigsäure

es wurde, um eine unerwünschte Verdünnung zu vermeiden, 5% (w/v) kristalline TCA zugesetzt. Weiteres Vorgehen siehe Abschnitt 3.2.4.4.

3.2.4.2. Blut

Ca. 3 ml frisch entnommenes venöses Blut wurde unter Kühlung auf +3°C
5 10 Minuten bei 1.085 g abzentrifugiert, danach bei gelbem Dämmerlicht der Überstand (Plasma) abgenommen und zu einem Aliquot 10%ige (w/v) TCA-Lösung bis zum Volumenverhältnis von 1/1 zugegeben. Auch hier ist das weitere Vorgehen in Abschnitt 3.2.4.4 beschrieben.

Zusätzliche Schritte zur Probenaufbereitung wurden versuchsweise eingeführt,
10 in späteren Stadien jedoch wieder verworfen; ausserdem wurden verschiedene Systeme zur Blutentnahme miteinander verglichen. Der Einfluss weiterer Parameter, wie Dunkelheit und sofortige Kühlung, die Bestimmung der maximalen Transportfähigkeit und der maximalen Zeitspanne zwischen Entnahme und Zentrifugation wurde ebenfalls in die Untersuchungen einbezogen, soll hier aber
15 nicht weiter ausgeführt werden.

3.2.4.3. Urin

Die jeweils zu untersuchenden Urinfraktionen wurden vollständig aufgefangen und ihr Volumen erfasst. Ein Aliquot wurde mit 10%iger (w/v) TCA-Lösung bis zum Volumenverhältnis von 1/1 aufgefüllt. Weitere Bearbeitung siehe Abschnitt 3.2.4.4.
20

Alternativ zum beschriebenen Verfahren, das keine Einstellung des durch die TCA-Zugabe dominierten pH-Wertes im Urin vorsieht, wurde experimentell auch nach dem Zentrifugieren die gesamte Probe mittels Natriumacetat eingestellt, dies wurde später zugunsten des in Abschnitt 3.2.4.5 erläuterten Verfahrens
25 nicht beibehalten. Ebenfalls nicht fortgesetzt wurden Versuche, die TCA-Fällung erst nach der Inkubation vorzunehmen.

3.2.4.4. gemeinsame Aufbereitungsschritte

Im Anschluss an die Probengewinnung erfolgte eine einheitlich gestaltete Aufbereitung. Die TCA-haltigen Proben wurden unter Kühlung je nach Gerät
30 20 Minuten bei 37.000 g oder 30 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert. Die Überstände aus dreifach paralleler Aufbereitung wurden vollständig abgenommen, vereinigt und falls erforderlich auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Dieses Auffüllen war nur notwendig bei der Untersuchung von festen Lebensmitteln, um die Konzentration an B6-Formen [nmol/l] auf das gewichtsmässig erfasste
35 Ausgangsmaterial umrechnen zu können.

Die klare Lösung konnte, sofern eine Bestimmung von gebundenem Vitamin B6 nicht vorgesehen war, in das HPLC-System gegeben werden. Eine zunächst eingeführte Festphasenextraktion als zusätzlicher Reinigungsschritt wurde wieder verworfen, da weder die erhaltenen Chromatogramme noch die Lebensdauer der HPLC-Kartuschen grössere Veränderungen zeigten. Falls in Einzelfällen die Probe nicht vollständig klar erschien, wurde eine zusätzliche Ultrazentrifugation vorgenommen. Der Überstand konnte danach weiterverwendet werden, das Präzipitat, dessen Volumen stets deutlich unter 0,5% lag, wurde stichprobenartig in Bidest oder 25% (v/v) Methanol aufgenommen und auf <Vitamin B6+PA> untersucht, in keinem Fall konnten signifikante Mengen gefunden werden. Bedingt durch den niedrigen pH-Wert (TCA-Zugabe) waren die Proben mehrere Tage bei -18°C lagerfähig.

Nach Erstellung der Eichgeraden zeigte sich, dass die zu untersuchenden (physiologischen) Proben im linearen Wertebereich der Fluoreszenz-Detektion lagen oder höher konzentriert waren. Dennoch wurde ein Verfahren zur Aufkonzentration des Untersuchungsmaterials bereitgestellt: Der Einsatz eines Vakuumverdampfers¹² nach dem Vereinigen der Zentrifugenüberstände erwies sich als geeignet. Hierbei wurden bis zum Faktor drei keine Veränderungen der Probe festgestellt, d.h. das Chromatogramm einer rückverdünnten Probe unterschied sich nicht relevant vom Ausgangsbild.

3.2.4.5. Enzymatischer Aufschluss

Ausgehend von der Methode von Sierra 1997 [129] wurde zur quantitativen Erfassung der glykosidisch gebundenen B6-Formen ein dreistufiges Verfahren etabliert.

25 Tabelle 4 Methodenparameter (Enzymbehandlung) im Vergleich zu Sierra 1997

Parameter	Sierra	hier:
Proben	Hülsenfrüchte (gemahlen)	Lebensmittel (Zubereitungen) Blut (Plasma) Urin
Probenaufbereitung	TCA-Fällung (1+100, 5%) Filtration Verdünnung (4+1) pH 4,8 mit 4M Na-Acetat weitere TCA-Zugabe (ca. 5,5+1,2 20%) nach Dephosphorylierung	TCA-Fällung (1+1, 10%) ggf. 30 min Ultraschallbad Zentrifugation

¹² SpeedVac Plus SC110A (ThermoQuest GmbH, Egelsbach)

Parameter	Sierra	hier:
TCA-Gehalt ¹³ vor Deglykosylierung	ca. ¹⁴ 10	0,1
pH-Einstellung vor Deglykosylierung	5,0 mit 4M Na-Acetat	5,0 mit 4M Na-Acetat
Enzymzugabe zur Dephosphorylierung	saure Phosphatase	keine Dephosphorylierung
Enzymzugabe zur Deglykosylierung	β -Glucosidase Suspension (ca. 3,2 Units/ml ¹⁵)	β -Glucosidase Suspension (4~5 Units/ml)
Inkubation zur Deglykosylierung	300 Minuten bei 37°C	250 Minuten bei 37°C
Probennachbereitung	weitere TCA-Zugabe (ca. 20+1,2 20%) Filtration	nur Einfrieren

Die aufbereiteten Proben wurden in drei Teile aufgeteilt:

- o der erste Aliquot wurde ohne zusätzliche Bearbeitungsschritte gemessen und als Teil-Probe "**R**" ("roh") gekennzeichnet.
- 5 o im zweiten Aliquot wurde zur Inkubation der pH-Wert mit 4M Natriumacetat-Lösung auf 5,0 eingestellt und einige Tropfen einer Glucosidase-Suspension zugegeben (ca. 4,5 U/ml): Teil-Probe "**E**" ("Enzym").
- o der dritte Aliquot wurde wie vorstehend behandelt, jedoch statt Glucosidase-Suspension die gleiche Menge Bidest zugesetzt, Probenkennzeichnung "**I**" ("inkubiert").

Die Teilproben "E" und "I" wurden 250 Minuten bei 37°C in verschlossenen Reaktionsgefäßen inkubiert, ggf. verdünnt und danach bei -18°C eingelagert. Die Glucosidase wurde durch das Einfrieren bzw. starkes Kühlen inaktiviert, ein Rückstellen des pH-Wertes war, auch aufgrund der vollständig abgelaufenen

15 Reaktion, nicht erforderlich. (Versuchsreihen mit zusätzlicher Neutralisation bzw. zur Dauer und Dosierung der Glucosidase-Inkubation siehe Anhang).

Anschliessend wurden die B6-Formen mit Ausnahme von PN und PA aus der HPLC-Messung der Fraktion "R" bestimmt. Die freien nicht-phosphorylierten B6-

¹³ absolute Menge TCA zu absoluter Menge Probenmatrix, ohne Berücksichtigung des Volumens.

¹⁴ genauer Wert nicht ermittelbar, da Menge des Natriumacetats zur pH-Einstellung nicht angegeben.

¹⁵ Wert bezogen auf Gesamtvolumen der Probe, bei Sierra Schätzwert wegen nicht angegebenen Volumens der beiden Natriumacetat-Zugaben.

Formen PN und PA konnten den Werten "I" entnommen werden und die gebundenen B6-Formen ergaben sich als Differenz zwischen "E" und "I".

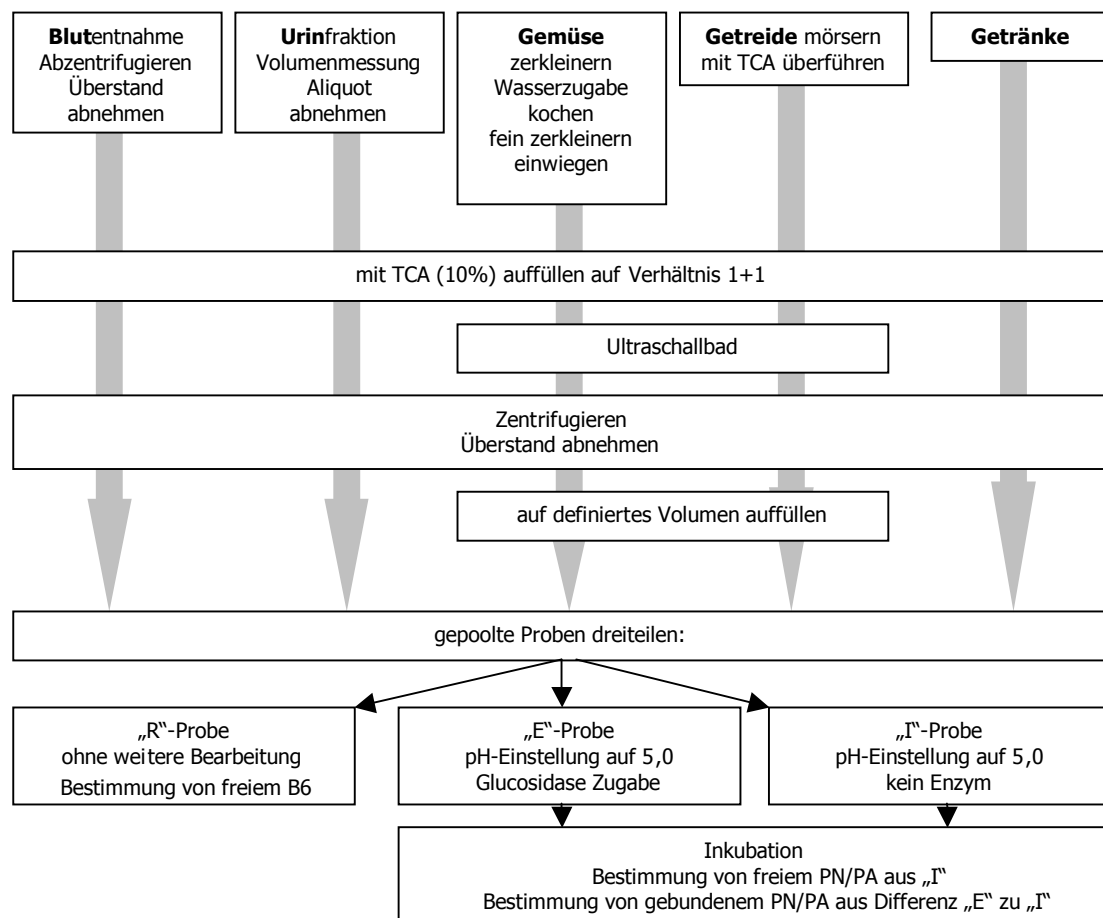


Abbildung 4 Schematischer Ablauf der Probenaufbereitung

5 3.2.5. Kinetische Vorversuche

Im Rahmen der kinetischen Versuche wurden an einem Probanden verschiedene Abläufe der geplanten Versuchstage in der Praxis optimiert, zu diesen gehörten:

- **Zeitpunkte und Anzahl der Blutentnahmen** – Ermittlung einer ausreichenden Datenmenge für die kinetischen Berechnungen bei möglichst geringer Anzahl der Blutentnahmen.
- **Untersuchungen**, inwieweit **körperliche Aktivität** der Probanden die Plasmaspiegel oder die Exkretion der B6-Formen, speziell PLP (Plasma) und PA (Urin), beeinflussten.
- **Ermittlung der Versuchsdauer**, d.h. wie lange die einzelnen Versuchstage dauern sollten und welcher zeitliche Abstand voneinander einzuhalten war.

- Der **Einfluss des zirkadianen Rhythmus** wurde untersucht an Versuchstagen mit bis zu drei Probanden, die entweder nüchtern blieben oder nur Mineralwasser (ohne Vitaminzusatz) tranken; die Versuche wurden zu unterschiedlichen Tageszeiten wiederholt, ähnlich wie bei Maschner 1993 [90] wurde auch in dieser Arbeit kein signifikanter Einfluss festgestellt.
 - Alle Testmahlzeiten wurden einheitlich in einem Zeitraum von 10 Minuten verzehrt und waren in Bezug auf Konsistenz und Zusammensetzung auf kurze (Magen-)Passagezeiten hin optimiert, da die Messung der **Magen-entleerungszeit** unter den gegebenen Bedingungen nicht zu realisieren war.
 - **Zu applizierende Menge an Vitamin B6** - Kompromiss zwischen exakter analytischer Erfassung von Konzentrationsänderungen im Plasma und einer möglichst niedrigen, d.h. physiologischen Dosierung.
- Die wesentlichen Daten zu den kinetischen Vorversuchen sind, sofern nicht im Ergebnisteil berücksichtigt, im Anhang enthalten.

3.3. Humanstudien

3.3.1. Probengewinnung

Die Probenaufbereitung wurde bereits im Rahmen der methodischen Arbeiten ausführlich beschrieben, daher wird hier nur auf die jeweiligen Abschnitte verwiesen.

3.3.1.1. Trinklösungen

Zur Analyse wurden dreimal 0,5 ml Saft bzw. trinkfertige Lösung nach den Vorschriften des Abschnittes 3.2.4.1.3 bearbeitet.

3.3.1.2. Blutentnahmen

- 10 Zu Beginn des Versuchstages wurde nach einem routinemässigen ärztlichen Gesundheitscheck eine Venenverweilkanüle¹⁶ (je nach Zugänglichkeit 0,9 bis 1,3 mm Durchmesser) in die v. cubitalis eingelegt und daraus 3 ml Nüchternblut entnommen. Bei den Blutentnahmen, die - um Transportwege zu verkürzen - in unmittelbarer Nähe der Kühlzentrifugen erfolgten, wurden die ersten Tropfen
- 15 Blut verworfen, um Reste von Spülflüssigkeit oder Ablagerungen zu entfernen. Danach wurden 2 bis 3 ml Blut in heparinisierten Sterilcontainer aufgefangen, wobei zur Vermeidung von Hämolyse kein oder möglichst geringer Unterdruck eingesetzt wurde. Vor dem Wiederverschluss der Verweilkanüle mit Mandrins wurde mit einigen Tropfen heparinisierte isotonische NaCl-Lösung gespült.
- 20 Falls zwischen vorletzter und letzter Blutentnahme ein grösserer Zeitabstand lag, wurde ggf. auf Wunsch der Probanden die Verweilkanüle schon vorzeitig entfernt und die letzte Blutprobe durch Einmalsets ("Butterfly") entnommen. Die Weiterbehandlung des Blutes erfolgte entsprechend Abschnitt 3.2.4.2.

3.3.1.3. Urinsammlung

- 25 Die Probanden begannen bereits eine oder mehrere Stunden vor Beginn des Versuchstages mit dem Auffangen der Miktionen. Nachdem das Volumen protokolliert war, haben die Versuchspersonen 2 bis 3 Milliliter Urin in Braunglasflaschen überführt und auf Eis zur weiteren Aufarbeitung bereitgestellt (siehe Abschnitt 3.2.4.3). Nachdem im Rahmen der Vorversuche der Einfluss eines zirkadianen Rhythmus auf die (Nüchtern-)Ausscheidung von PA bzw. Vitamin B6
- 30 ausgeschlossen werden konnte, wurde mit Hilfe der o.g. Nüchternurinfraktionen

¹⁶ Braunüle 16G, 18G bzw. 20G, Braun AG Melsungen, (www.bbraun.com)

die Basisexkretion von B6-Formen bestimmt und zur Nüchternwertbereinigung der Messwerte herangezogen.

3.3.1.4. Lagerung

Die messfertig aufbereiteten Proben wurden bis zur Messung maximal 10 Tage bei -18°C eingelagert und erst zur Messung in Eiswasser und bei Dunkelheit aufgetaut. Ebenfalls in Dunkelheit auf Eis wurde Untersuchungsmaterial am Versuchstag zwischen einzelnen Aufbereitungsschritten falls notwendig für kurze Zeit gelagert. Abweichend hiervon erfolgte eine Zwischenlagerung grundsätzlich nicht für frische Blutproben.

3.3.2. Versuchsdurchführung

Insgesamt standen für die Hauptversuche sechs Männer und sechs Frauen zur Verfügung. Das mittlere Alter bei Versuchsende betrug $28,7 \pm 4,2$ Jahre (Männer: $29,7 \pm 3,9$, Frauen: $27,7 \pm 4,7$), der mittlere BMI¹⁷ wurde errechnet zu $21,2 \pm 2,4 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ (Männer: $22,1 \pm 2,9$, Frauen: $20,3 \pm 1,5$). Die gesunden Versuchspersonen nahmen im Rahmen der Hauptversuche freiwillig und unentgeltlich an mindestens zwei und höchstens sechs Testreihen teil.

Tabelle 5: Zuordnung der Versuchspersonen (VP) zu den Testreihen (T) der Hauptversuche

VP	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
T1 Tiefkühl- Blumenkohl	•	•	•									
T2 marktfrischer Blumenkohl	•	•	•									
T3 Reinsubstanz p.o. (prop.)	•	•	•									
T4 Reinsubstanz p.o. (konst.)	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
T5 glucosidreicher Karottensaft	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
T6 Reinsubstanz i.v.	•											

¹⁷ Body-Mass-Index, $(\text{Körpergewicht} [\text{kg}]) \cdot (\text{Körperlänge} [\text{m}])^{-2}$

3.3.2.1. Testreihe 1 (Tiefkühlblumenkohl)

Glykosidreicher Tiefkühl-Blumenkohl¹⁸ wurde wie in Abschnitt 3.2.4.1.1 zubereitet, es erfolgte lediglich leichtes Salzen der zubereiteten Paste durch die Probanden. Auf die Zugabe von Gewürzen etc. wurde wegen deren B6-Gehaltes
5 verzichtet. Die Probanden verzehrten als Testmahlzeit 10 g Blumenkohlpaste je kg Körpergewicht. Der Gehalt an Vitamin B6 betrug ca. 1,5 mg, entsprechend den DGE-Zufuhrempfehlungen für Erwachsene, die genauen Mengen sind in den Einzelbeschreibungen des Kapitel 4 aufgezählt.

Die Menge an aufgenommenen B6-Formen wurde durch Analyse der verzehrsfertige Blumenkohlpaste in Verbindung mit der durch Differenzwägung des Essgeschirrs bestimmten Verzehrsmenge ermittelt. Über einen Zeitraum von 6 oder
10 mehr Stunden wurden 10 Blutproben und über 8 Stunden die Stundenerine gesammelt.

3.3.2.2. Testreihe 2 (marktfrischer Blumenkohl)

Marktfrischer Blumenkohl wurde am Vortag in ausreichenden Mengen von mehreren Giessener Einzelhändlern bezogen und auf seinen Gehalt an B6-Formen untersucht. Am Versuchstag wurde aus diesem Angebot eine Blumenkohlmischung zusammengestellt, die in der verzehrsfähigen Paste einen den Tiefkühlprodukten vergleichbaren Gehalt an Vitamin B6 besass, jedoch ein deutlich
20 verschiedenes Vitamer-Spektrum und insbesondere einen niedrigeren Gehalt an gebundenen Vitameren. Der weitere Ablauf entsprach der Testreihe .

3.3.2.3. Testreihe 3 (Pyridoxin p.o. – prop.)

Vitamin B6 als Reinsubstanz (Pyridoxin-Hydrochlorid) wurde in 0,4 l kohlensäurefreiem Mineralwasser¹⁹ gelöst und von den Probanden getrunken, die Vitamin B6-Dosis entsprach den Werten aus Testreihe 1 bzw 2, d.h. zum Körpergewicht proportionale Dosierung. Der Urin wurde stündlich gesammelt
25 (8 Proben), zusätzlich wurden noch mindestens 6 Blutproben entnommen. Da alle 3 Probanden dieser Testreihe auch an der sehr ähnlich gestalteten Testreihe 4 teilnahmen, wurden in Testreihe 3 gegen Ende des Versuchstages (abfallender Schenkel der Blutspiegelkurve) weniger Blutproben entnommen, um die
30 Belastung der Versuchspersonen zu minimieren.

¹⁸ Mischung aus Füllhorn Öko-Blumenkohl, REWE Köln und Blumenkohl tiefgefroren, Frosta Bremerhaven

¹⁹ "bizzl Mineralwasser ohne" Bad Vilbeler Urquelle GmbH, Bad Vilbel

3.3.2.4. Testreihe 4 (Pyridoxin p.o. – 1,5mg)

Der Ablauf entsprach der vorangegangenen Testreihe 3, die Vitamin B6 war jedoch konstant auf der Höhe der Referenzwerte für die Zufuhr, d.h. 7,3 µmol Vitamin B6 als Reinsubstanz (1,5 mg Pyridoxin-Hydrochlorid) und die Trinkmenge betrug 0,5 l. Es wurden über 7 oder mehr Stunden jeweils mindestens 11 Blutproben sowie 9 Stundenurine gesammelt.

3.3.2.5. Testreihe 5 (Karottensaft)

Unverdünnter Karottensaft²⁰ aus biologischem Anbau wurde auf seinen Gehalt an freien und gebundenen B6-Formen untersucht und aus einer Reihe von ähnlichen Produkten ausgewählt. Alle Probanden erhielten aus der gleichen Charge eine Saftmenge, die 7,3 µmol Vitamin B6 (1,5 mg Pyridoxin-Hydrochlorid) enthielt, das Trinkvolumen wurde wie in Testreihe 4 auf 0,5 l mit kohlenstoffsaurem Mineralwasser aufgefüllt.

3.3.2.6. Testreihe 6 (Pyridoxin i.v.)

Zu Vergleichszwecken wurde bei einem Probanden, der an allen vorgenannten Testreihen teilnahm, nach intravenöser Injektion in die v. cubitalis sin. von 1,494 mg PN-Salz²¹ (7,3 µmol) wurden über einen Zeitraum von 7 Stunden insgesamt 18 Blutproben aus der v. cubitalis dex. entnommen und über 8 Stunden die Urinfraktionen gesammelt.

Als Injektionslösung wurde "B-Komplex Lichtenstein N"²² verwendet, die injizierte Menge konnte über die Gewichts Differenz der Einmalspritze vor und nach Applikation in Verbindung mit einer Quantifizierung der Vitamere entsprechend Abschnitt 3.2.4.1.3 und Dichtebestimmung der Injektionslösung exakt ermittelt werden.

3.3.2.7. Ablauf der Versuchstage

Zur Auffüllung der Körperspeicher erhielten die Versuchspersonen einige Tage vor der jeweiligen Testreihe handelsübliche Multivitaminpräparate²³ im Rahmen der D,A,CH-Referenzwerte. Die Supplementation wurde 36 Stunden vor Versuchsbeginn eingestellt, 10 Stunden vor Beginn nahmen die Probanden keine Nahrung mehr zu sich. Zu Beginn des Versuchstages wurde die Testdosis über einen Zeitraum von 10 Minuten appliziert. Die Probanden nahmen in den ersten

²⁰ "Bio Möhrensaft mit Mark" Fit&Activ Vitalkost VertriebsGmbH, Lüneburg

²¹ Pyridoxin-Hydrochlorid

²² Lichtenstein Pharmazeutica, Mülheim-Kärlich (PZN –4923322)

²³ "Multi-Vitamin Brausetabletten" BioLabor GmbH, Bremen

zwei Stunden keine zusätzlichen Getränke auf, im weiteren Verlauf wurde in gleichmässigen Dosen kohlensäurearmes Tafelwasser oder Schwarzer Tee²⁴ getrunken, wobei die Probanden die Trinkmengen protokollierten und an allen Versuchstagen gleich hielten. Über die Testmahlzeiten hinaus wurden keine
5 Speisen verzehrt, jedoch konnten die Probanden in den letzten drei Stunden vor Versuchsende ihre Getränke mit Glucose (handelsübliches "Traubenzucker"-Erzeugnisse, <Vitamin B6+PA> nicht nachweisbar) ad lib. süssen, um Hypoglykämie zu vermeiden.

Die Versuchsdurchführung und der Versuchsablauf wurden, da im Fachbe-
10 reich 09 der Justus-Liebig-Universität eine Ethikkommission nicht besteht, der "Ethik-Kommission für Ärztliche Forschung am Fachbereich Humanmedizin" der Justus-Liebig-Universität angezeigt und genehmigt. Die Probanden standen unter medizinischer Überwachung der dem Institut angehörenden Ärzte und wurden vor Versuchsbeginn ausführlich über Testreihen und Risiken informiert und
15 erklärten schriftlich ihre Bereitschaft zur Teilnahme, die entsprechenden Formulare sind im Anhang auf Seite 133 ff. abgedruckt.

3.3.3. Auswertungen

3.3.3.1. deskriptive Statistik

Aus den Mittelwerten der einzelnen Detektionen der B6-Formen wurden mittels
20 der erstellten Eichgeraden und unter Einbezug der Verdünnungsfaktoren die Konzentration [nmol/l] bzw. bei festen Untersuchungsmaterialien eine andere geeignete Angabe [nmol/100g] errechnet. In die arithmetischen Mittelwerte wurden stark abweichende Einzelergebnisse nicht einbezogen und entsprechende Varianzanalysen eingesetzt. Mit Hilfe des Student'schen t-Tests²⁵ wurde
25 beurteilt, ob zwei Stichproben denselben Mittelwert haben oder sich signifikant voneinander unterscheiden, die entsprechenden Wert für " p " sind jeweils angegeben.

Bei den weiteren Auswertungen in Kalkulationstabellen wurde ggf. neben den Mittelwerten die Standardabweichung (SD) ermittelt. Zur Bestimmung von Ge-
30 radengleichungen wurden die von der eingesetzten Standardsoftware²⁶ vorge-

²⁴ Der <Vitamin B6+PA> Gehalt des Tees wurde mehrfach überprüft und war vernachlässigbar gering.

²⁵ SPSS 10.1.3 für Windows, SPSS Inc. Chicago US

²⁶ Excel 2000 (9.0.4402), Microsoft GmbH Unterschleissheim

schlagenen Gleichungen zusätzlich noch durch ein spezielles Tool zur Kurvendiskussion²⁷ optimiert.

3.3.3.2. grafische Darstellung

- 5 Zur grafischen Darstellung der Konzentrations-Zeit-Profile war die eingesetzte Standard-Software hinreichend leistungsfähig, die Anpassung an das Zweikompartiment Modell erfolgte mit spezifischer Software (siehe folgender Abschnitt).

²⁷ Agraph 4.17: BB-Software, Anorage, US

3.3.3.3. biokinetische Parameter

Zur Bestimmung biokinetischer Parameter wurde eine spezielle Software zur Pharmakokinetik²⁸ eingesetzt, mit deren Hilfe es möglich war, Mehrkompartiment-Modelle durchzurechnen. Für die eingesetzten Vitamin B6-Dosierungen erwies sich ein Zwei-Kompartiment-Modell als am besten geeignet²⁹, dabei werden die Kompartimente nicht im Sinne einer anatomischen Abgrenzung, sondern als Unterschiede der physiologischen Mobilisierbarkeit gesehen.

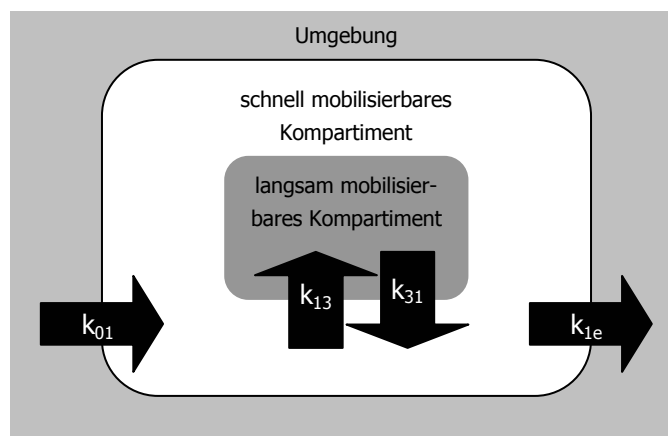


Abbildung 5: Darstellung der Kompartimente und Invasions- bzw. Evasionskonstanten³⁰

Diese Modelle wurden auf die um die Nüchternwerte bereinigten Plasmaspiegel von totalem Vitamin B6 angewendet und die Fläche unter der Kurve (Netto-AUC) der resultierenden Funktionsgrafen ermittelt. Weitere berücksichtigte Größen sind die höchste rechnerische Konzentration im Modell $c_{\max}$ [nmol/l] zum Zeitpunkt $t_{\max}$ [h] oder [min], das rechnerische Verteilungsvolumen im Fließgleichgewicht V_{ss} [l] (i.v.-Versuch) sowie die Geschwindigkeitskonstanten k (siehe Abbildung 5) und die Nettoexkretion [nmol] an <Vitamin B6+PA>. Die Nüchternwertbereinigung erfolgte mit Hilfe der in Abschnitt 3.3.1.3 ermittelten Basisexkretion bzw. anhand der Nüchternplasmawerte (s. Abschnitt 3.3.1.2).

3.3.3.4. Berechnung der Bioverfügbarkeit

Bezugsgrösse (100 %) für die Bestimmung der (absoluten) Bioverfügbarkeit ist definitionsgemäss die i.v.-Applikation. Dies wurde exemplarisch für Versuchsperson 01 durchgeführt und alle weiteren Testreihen zur Testreihe 6 (i.v.) ins Verhältnis gesetzt. Für die weiteren Versuchspersonen wurde die relative Bio-

²⁸ Heinzl-G, Woloszczak-R, Thomann-P; TopFit 2.0 Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis System; Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1993

²⁹ 1- und 3- Kompartimentmodelle wurden mit allen Daten gerechnet, sind aber hier nicht wiedergegeben.

³⁰ Software-bedingt wird das Tiefenkompartiment als Nr. 3 (statt Nr. 2) bezeichnet.

verfügbarkeit bestimmt. Hier wurde die Testreihe 4 (p.o. 1,5mg) und ggf. Testreihe 3 (p.o. prop.) als Bezugsgrösse eingesetzt.

Bei den Blumenkohl- und Karottensaft-Testmahlzeiten war noch die unterschiedliche Verfügbarkeit der freien und der gebundenen B6-Formen von Interesse. Mit der folgenden Näherungsrechnung sollte (unter Ausserachtlassung von Wechselwirkungen) eine Abschätzung der Bioverfügbarkeit (BV) der gebundenen B6-Formen vorgenommen werden.

- Die BV von Vitamin B6 aus einer Testmahlzeit (BV_{Gesamt}) setze sich zusammen aus der BV der freien B6-Formen (BV_{fr}) und der BV der gebundenen B6-Formen (BV_{geb}):

$$BV_{Gesamt} = BV_{fr} + BV_{geb}$$

- Der Gehalt (b) an gebundenen B6-Formen der Testmahlzeit (Pb) sei bekannt, dann muss gelten:

$$BV_{Pb} = (1-b) \cdot BV_{fr} + b \cdot BV_{geb}$$

- Aus den Ergebnissen der Hauptversuche können neben b auch die Werte für BV_{Pb} und BV_{fr} abgelesen werden, damit verbleibt nur noch eine Unbekannte in der Gleichung, die sich dann wie folgt umformen lässt:

$$BV_{geb} = \frac{BV_{Pb} + (b-1) \cdot BV_{fr}}{b}$$

Gleichung 1 zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit (BV) gebundener B6-Formen aus bekannten Werten für BV und Gehalt (b)

4. Ergebnisse

4.1. Lebensmittel

Die Daten aus den methodenbezogenen Arbeiten sind im Anhang wiedergegeben, mit Ausnahme der in verschiedenen Lebensmitteln bestimmten Vitamin B6-Gehalte. Die angegebenen Werte sind auf die Testmahlzeiten, d.h. die verzehrsfertig zubereitete Form bezogen, nicht auf die Rohware.

Tabelle 6 Säfte: Gehalt an B6-Formen [nmol/l]

B6-Form	Karotten 1 ³¹	Karotten 2 ³²	Karotten 3 ³³	Tomaten ³⁴
PLP	470	390	220	350
PL	710	130	120	280
PMP	350	<50	<50	130
PM	580	<50	70	100
PN (frei)	5180	4460	3100	4220
PN (total)	12880	6200	6690	4360
Vitamin B6 (frei)	7290	5080	3560	5080
Vitamin B6 (total)	14990	6820	7150	5220
<i>gebundenes Vitamin B6</i>	<i>7700</i>	<i>1740</i>	<i>3590</i>	<i>140</i>
PA (frei)	1020	790	930	1210
PA (total)	1050	790	1010	1320
<Vitamin B6+PA> (frei)	8310	5870	4490	6290
<Vitamin B6+PA> (total)	16040	7610	8160	6540
<i>gebundenes <Vitamin B6+PA></i>	<i>7730</i>	<i>1740</i>	<i>3670</i>	<i>250</i>

Karottensaft 1 wurde in Testreihe 5 eingesetzt.

³¹ Fit & Activ Vitalkost GmbH, Bio-Möhrensaft mit Mark

³² Albi GmbH

³³ Niehoffs Vaihinger Fruchtsaft GmbH

³⁴ Niehoffs Vaihinger Fruchtsaft GmbH

Tabelle 7 Kohlgemüse: Gehalt an B6-Formen [nmol/100g] in verzehrsfertiger Form

B6-Form	Tiefkühl- Blumenkohl (Mittelwert)	Tiefkühl- Broccoli(Mittelwert)	marktfrischer Blumenkohl (Mittelwert)	marktfrischer Broccoli (Mit- telwert)
PLP	92	$\Sigma = 103$	84	$\Sigma = 158$
PL	31		40	
PMP	10		28	
PM	70		92	
PN (frei)	208	410	428	562
PN (total)	714	792	688	686
Vitamin B6 (frei)	411	513	672	720
Vitamin B6 (to- tal)	917	895	932	844
<i>gebundenes Vitamin B6</i>	<i>506</i>	<i>382</i>	<i>260</i>	<i>124</i>
PA (frei)	47	72	294	402
PA (total)	99	133	320	438
<Vitamin B6+PA> (frei)	458	585	966	1.122
<Vitamin B6+PA> (total)	1.016	1.028	1252	1.282
<i>gebundenes <Vitamin B6+PA></i>	<i>558</i>	<i>443</i>	<i>286</i>	<i>160</i>

Die Werte für Blumenkohl zeigten tendenziell geringere Schwankungsbreiten als die Werte für Broccoli, daher wurde Blumenkohl für die Probandenversuche ausgewählt.

4.2. Versuche zur Biokinetik

In diesem Abschnitt werden *mit Ausnahme der Nüchternwertbereinigung* Ergebnisse nur für Versuchsperson 01 dargestellt, die übrigen – identisch aufbereiteten – Werte sind im Anhang enthalten.

5 4.2.1. Basisexkretion

Zur Ermittlungen der Basisexkretion wurden vor den jeweiligen Testreihen zwei oder drei aufeinanderfolgende Nüchternurine gesammelt und totales <Vitamin B6+PA> [nmol/h] bestimmt (eine bzw. zwei Messungen); zur Nüchternwertbereinigung vgl. Abschnitt 3.3.1.3.

- 10 Tabelle 8 Nüchternexkretion [nmol/h] der Versuchspersonen (VP). Jeweils eine oder zwei Messungen von totalem <Vitamin B6+PA> im Vorfeld der Testreihen (T).

Testreihe	Messung	VP01	VP02	VP03	VP04	VP05	VP06	VP07	VP08	VP09	VP10	VP11	VP12
T1	1	504	1.022	476									
	2	486	1.010	492									
T2	1	510	1.003	510									
	2	501	1.017	500									
T3	1	522	1.056	471	563	434	377	427	477	911	645	611	740
	2	508	990	477	558		362		460	928	637		719
T4	1	504	1.079	487									
	2	497	1.021	475									
T5	1	517	1.054	489	553	430	383	459	439	956	653	624	733
	2	499	1.009	480		445		442	453	936		620	
T6	1	491											
	2	509											
Mittelwert		504	1.026	486	558	436	374	443	457	933	645	618	731
$\pm$ SD ³⁵		10	28	12	5	8	11	16	16	19	8	7	11

- 15 Der Mittelwert der Nüchternausscheidung je Stunde bei allen Versuchspersonen der Hauptversuche belief sich auf 601 ± 204 [nmol/h $\pm$ SD], die Nüchternausscheidung bezogen auf kg Körpergewicht betrug $9,0 \pm 1,4$ [nmol/h $\pm$ SD]; Werte aufgeschlüsselt nach männlichen und weiblichen Probanden siehe Tabelle 9.

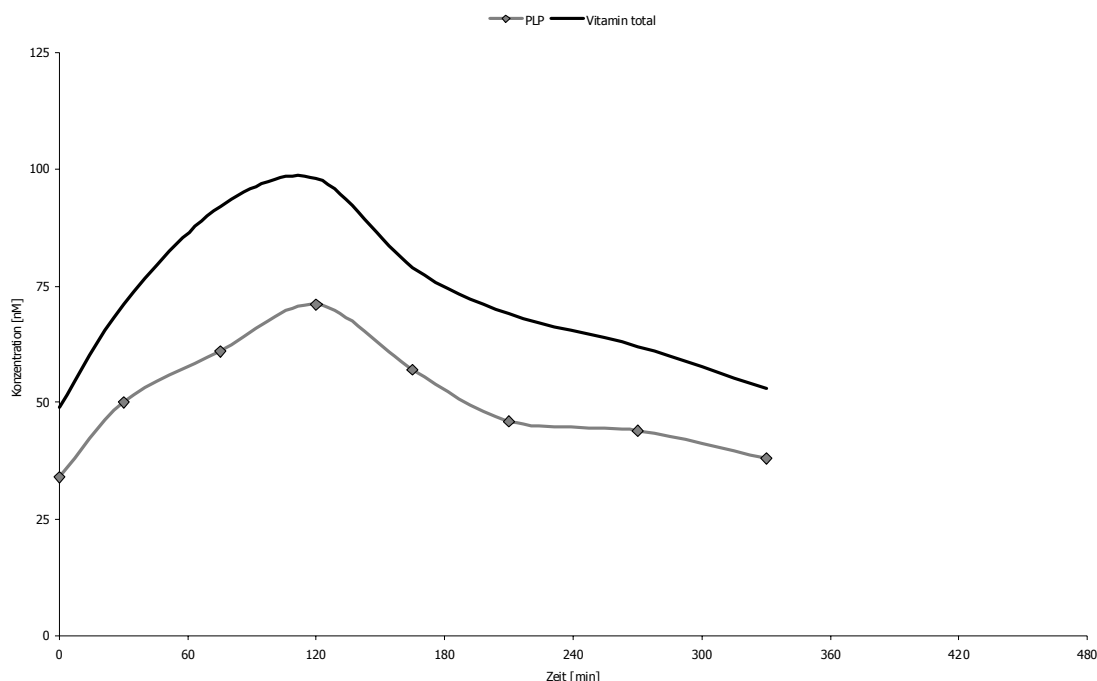
³⁵ Standardabweichung

Tabelle 9 Mittelwerte der Nüchternexkretion der zwölf Versuchspersonen

Parameter	Wert	Dimension
Nüchternexkretion totales <Vitamin B6+PA>	601 ± 204	nmol/h ± SD
nur Männer	743 ± 199	nmol/h ± SD
nur Frauen	459 ± 187	nmol/h ± SD
Nüchternexkretion totales <Vitamin B6+PA> je kg Körpergewicht	9,0 ± 1,4	nmol/(h·kg) ± SD
nur Männer*	10,1 ± 1,2	nmol/(h·kg) ± SD
nur Frauen*	8,0 ± 0,6	nmol/(h·kg) ± SD
* p	0,004 ³⁶	

4.2.2. Testreihe 1

Die folgenden Diagramme zeigen die Konzentrationen von PLP und Vitamin B6 nach Verzehr von Tiefkühlblumenkohl und die entsprechenden Werte für PA und <Vitamin B6+PA> im Stundenurin. Die Zusammensetzung und die Menge der verzehrten Blumenkohlzubereitung werden in Tabelle 10 aufgelistet, vollständige Datensätze und Diagramme der beiden anderen Versuchspersonen siehe Anhang.



10 Diagramm 1 Testreihe_1: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_01; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]

³⁶ ungepaarter T-Test

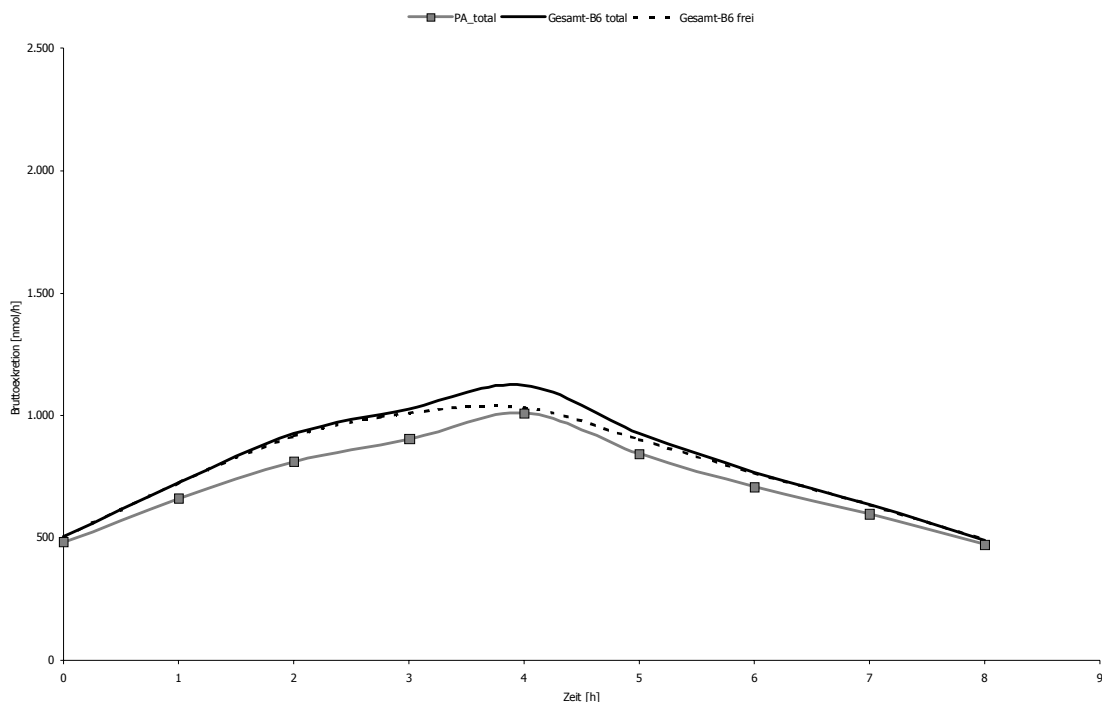


Diagramm 2 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—total, ...frei) je Stunde in Testreihe_1, Versuchsperson_01; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

- Die höchste Plasmakonzentration (98 nmol/l totales Vitamin B6) wird nach 120 min erreicht, (Mittelwert aller 3 VP: 125 min), die höchste Ausscheidung nach 4 h (1,1 µmol/h totales <Vitamin B6+PA>).

Tabelle 10 Applizierte Mengen an Vitamin B6 in Testreihe 1

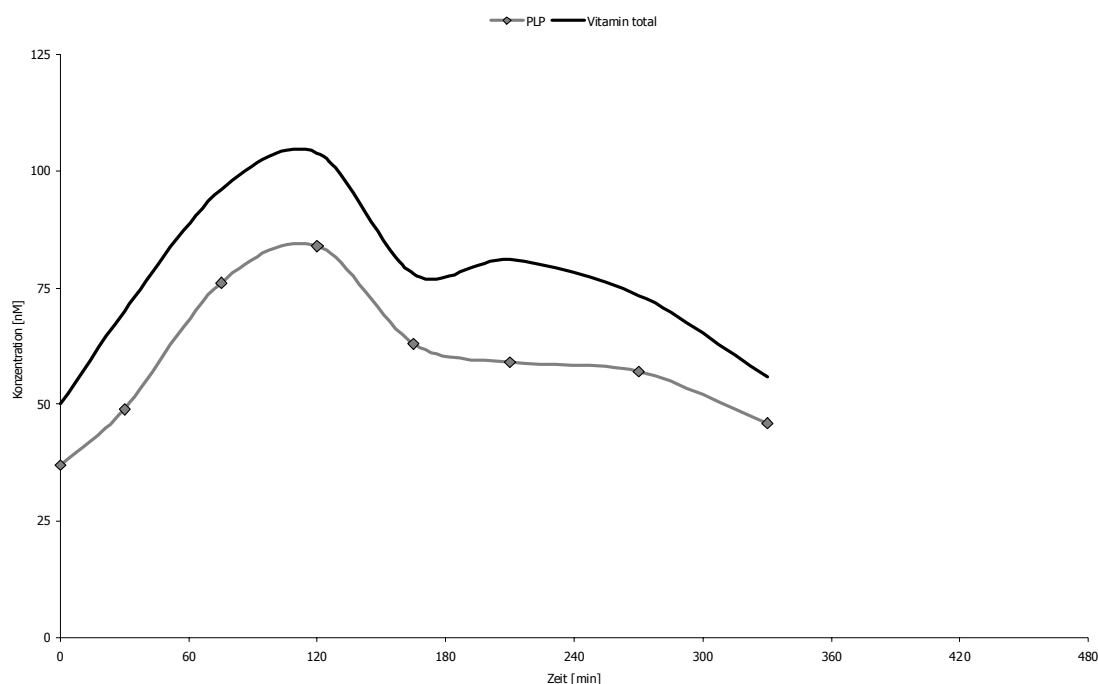
Versuchsperson	verzehre Menge [g]	Vitamin B6 [nmol/g]	appliziertes Vitamin B6 [nmol]	appliziertes Vitamin B6 [mg] berechnet als Pyridoxin-Hydrochlorid	davon gebundenes Vitamin B6	berechnetes Pyridoxin-Hydrochlorid je Körpergewicht [µg]
01	620	9,2	5.704	1,17	55 %	18,0
02	1.048	9,1	9.537	1,96	58 %	18,6
03	568	9,2	5.226	1,07	55 %	18,4

- Die geringen Schwankungen des Gehaltes an PNG waren durch die unterschiedlichen Gemüse-Chargen bedingt. Noch exakteres Auswiegen liessen die zur Verfügung stehenden Laborwaagen nicht zu.

4.2.3. Testreihe 2

Diagramm 3 zeigt die Konzentrationen von PLP und Vitamin B6 im Plasma nach Verzehr von marktfischem Blumenkohl, Diagramm 4 die entsprechenden Werte

für PA und <Vitamin B6+PA> im Stundenurin. Die Zusammensetzung und die Menge der verzehrten Blumenkohlzubereitung sind in Tabelle 11 verzeichnet, vollständige Datensätze und Diagramme der beiden anderen Versuchspersonen siehe Anhang.



5

Diagramm 3 Testreihe_2: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_01; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]

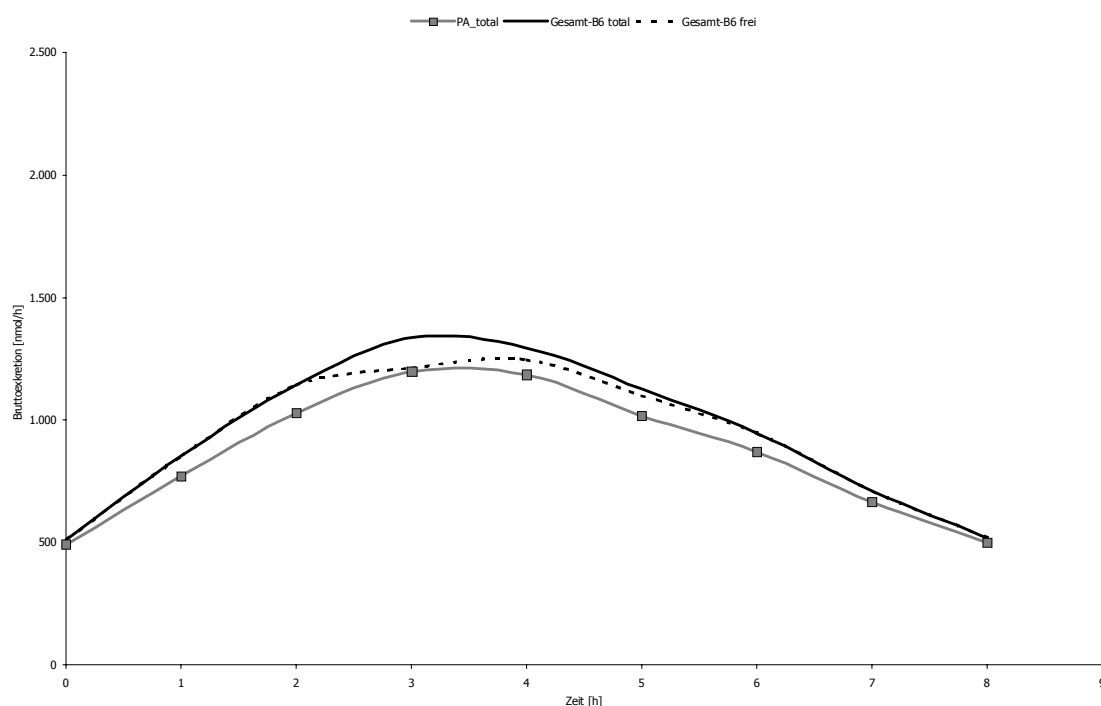


Diagramm 4 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—total, ...frei) je Stunde in Testreihe_2, Versuchsperson_01; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

10

Die höchste Plasmakonzentration (104 nmol/l totales Vitamin B6) wird nach 120 min erreicht, (Mittelwert der 3 VP: 105 min), die höchste Ausscheidung nach 3 h (1,2 µmol/h totales <Vitamin B6+PA>).

Tabelle 11 Applizierte Mengen an Vitamin B6 in Testreihe 2

Versuchsperson	verzehrtc Menge [g]	Vitamin B6 [nmol/g]	appliziertes Vitamin B6 [nmol]	appliziertes Vitamin B6 [mg] berechnet als Pyridoxin-Hydrochlorid	davon gebundenes Vitamin B6	berechnetes Pyridoxin-Hydrochlorid je kg Körpergewicht [µg]
01	613	9,4	5.762	1,18	27 %	18,1
02	1.034	9,2	9.513	1,96	30 %	18,4
03	575	9,4	5.405	1,11	27 %	19,1

5

Die geringen Schwankungen des Gehaltes an PNG waren durch die unterschiedlichen Gemüse-Chargen bedingt. Noch exakteres Auswiegen liessen die zur Verfügung stehenden Laborwaagen nicht zu.

4.2.4. Testreihen 3 und 4

- 10 Diagramm 5 bis Diagramm 8 zeigen die Konzentrationen von PLP und Vitamin B6 im Plasma nach oraler Aufnahme von Pyridoxin-Hydrochlorid (Testreihe 4), sowie die Werte für PA und <Vitamin B6+PA> im Stundenurin. Die jeweils aufgenommene Menge an Vitamin B6 ist in Tabelle 12 enthalten, vollständige Datensätze und Diagramme der anderen Versuchspersonen siehe Anhang.
- 15 Die Versuchspersonen 01 bis 03 haben zusätzlich an Testreihe 3 mit einer dem Körpergewicht proportionalen Vitamin B6-Dosierung teilgenommen.

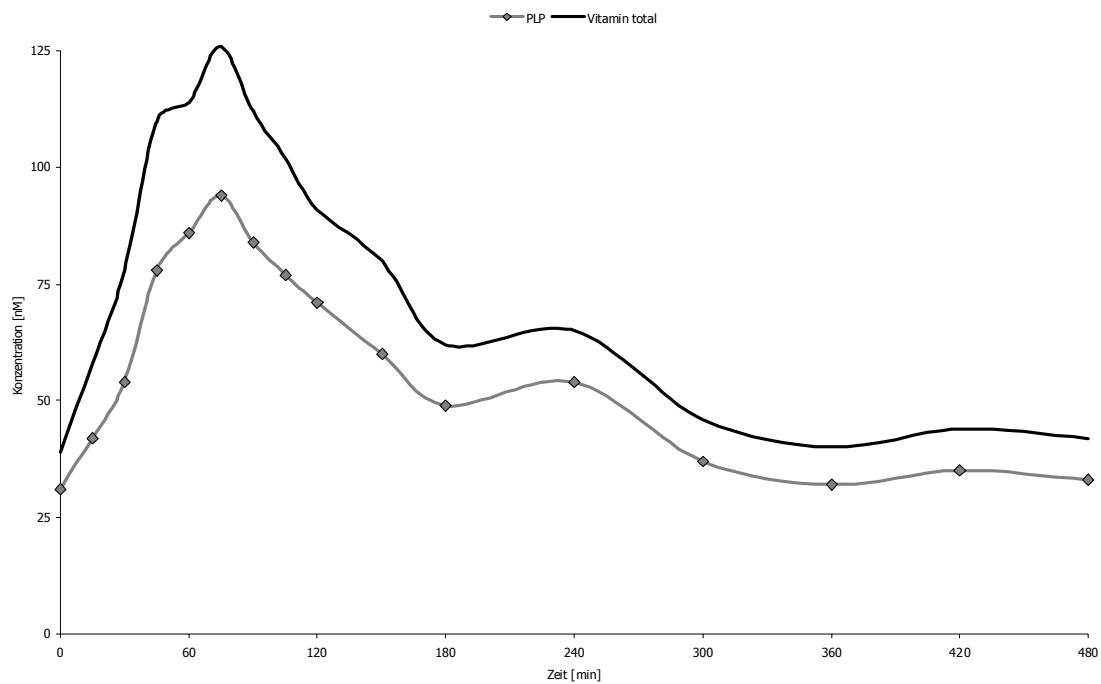
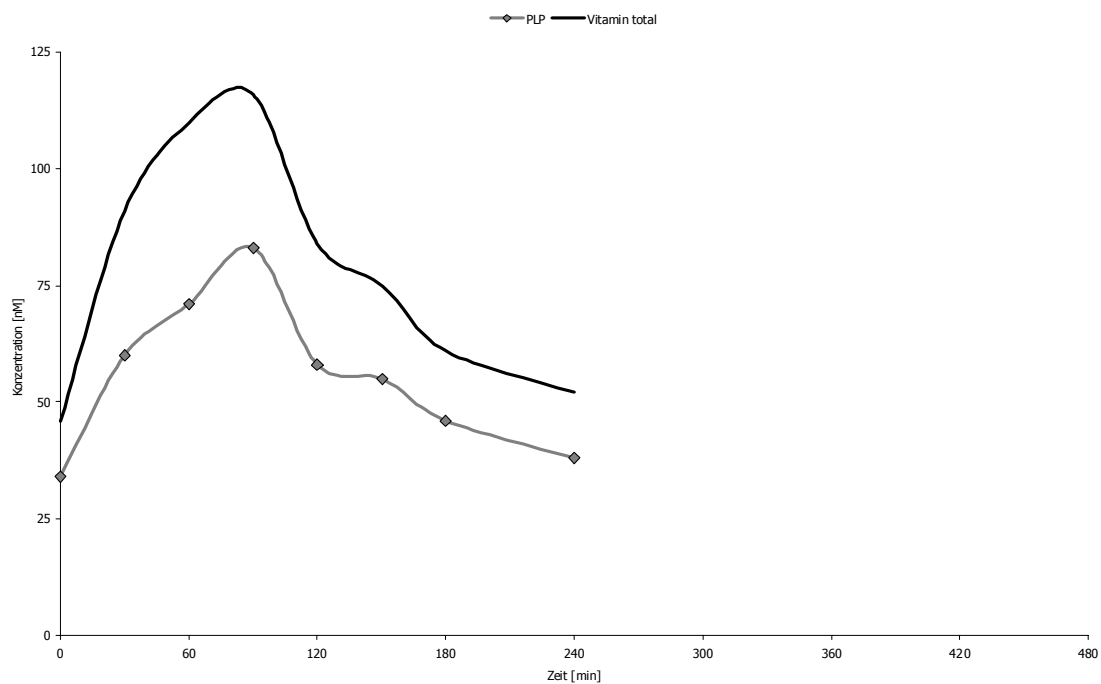


Diagramm 5 Testreihe_4: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_01; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



- 5 Diagramm 6 Testreihe_3: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_01, Durchführung mit proportionaler Dosierung; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]

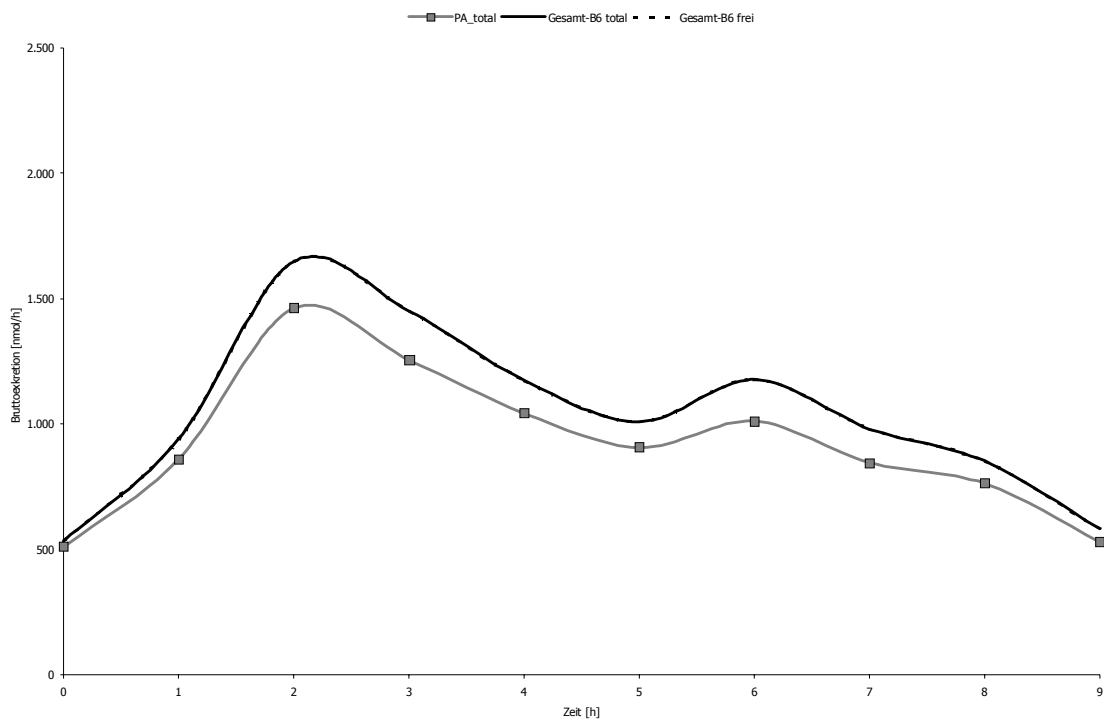
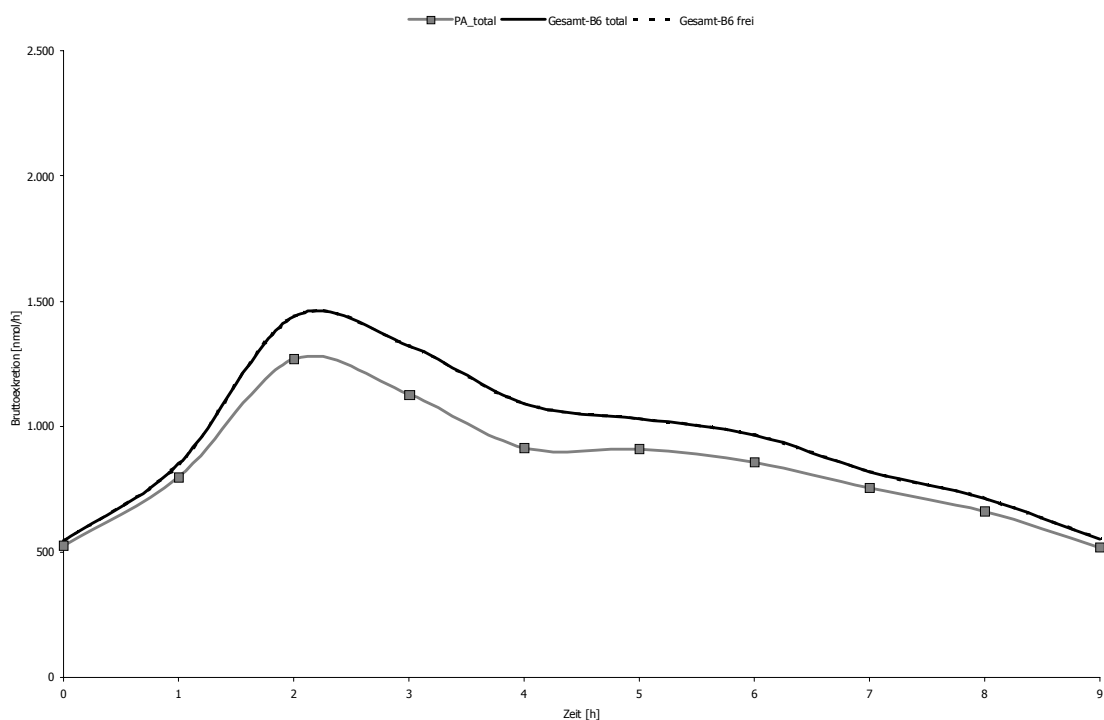


Diagramm 7 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—) je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_01; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]



- 5 Diagramm 8 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—) je Stunde in Testreihe_3, Versuchsperson_01, Durchführung mit proportionaler Dosierung; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

Die höchste Plasmakonzentration (*Werte siehe Tabellenteil*) wird im Mittel aller Probanden nach 87 min erreicht, die höchste Ausscheidung nach 2 Stunden.

Tabelle 12 Applizierte Mengen an Vitamin B6 in Testreihe 3 und 4

Tesreihe	Versuchsperson	Trinkmenge [ml]	appliziertes Pyridoxin-Hydrochlorid [mg]	entspricht rechnerisch Vitamin B6
3 (prop.)	01	400	1,18 ³⁷	5.738
	02	400	1,93 ³⁸	9.385
	03	400	1,05 ³⁹	5.106
4 (konstante Dosierung)	01	500	1,50	7.294
	02	500	1,50	7.294
	03	500	1,50	7.294
	04	500	1,50	7.294
	05	500	1,50	7.294
	06	500	1,50	7.294
	07	500	1,50	7.294
	08	500	1,50	7.294
	09	500	1,50	7.294
	10	500	1,50	7.294
	11	500	1,50	7.294
	12	500	1,50	7.294

4.2.5. Testreihe 5

Die beiden folgenden Diagramme zeigen die Konzentrationen von PLP und Vitamin B6 im Plasma nach Verzehr von Karottensaft und die Werte für PA und <Vitamin B6+PA> im Stundenurin. Die Zusammensetzung und die Menge des aufgenommenen Getränkes werden in Tabelle 13 aufgeführt, vollständige Datensätze und Diagramme der beiden anderen Versuchspersonen siehe Anhang.

³⁷ entspricht 18,1 µg je kg Körpergewicht

³⁸ entspricht 18,3 µg je kg Körpergewicht

³⁹ entspricht 18,1 µg je kg Körpergewicht

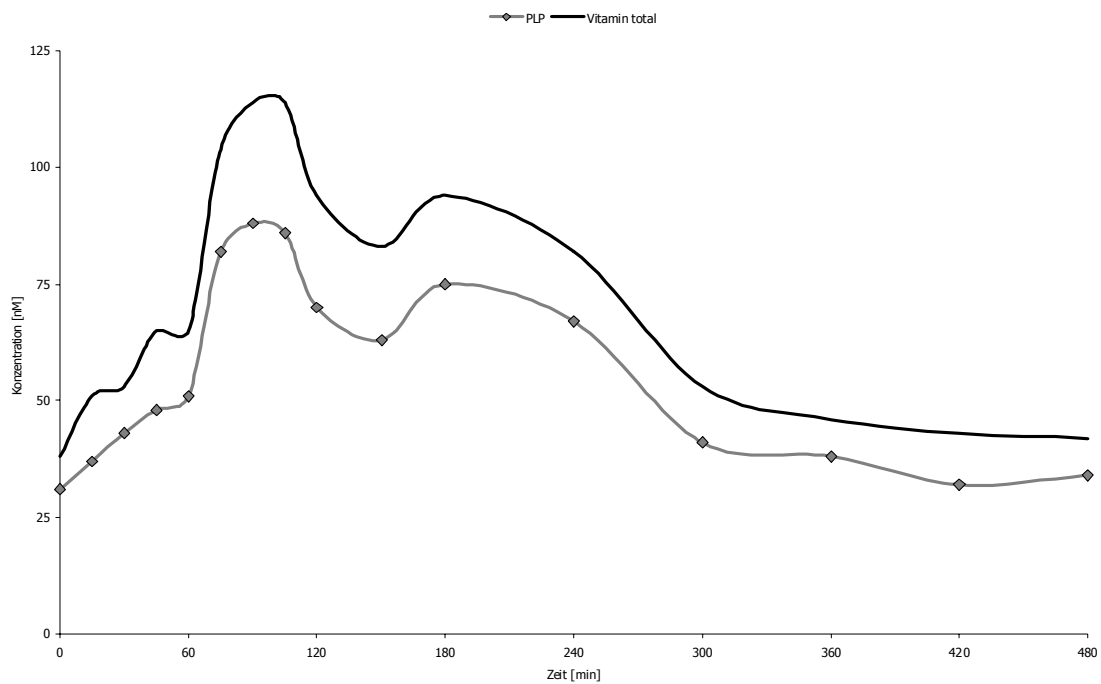
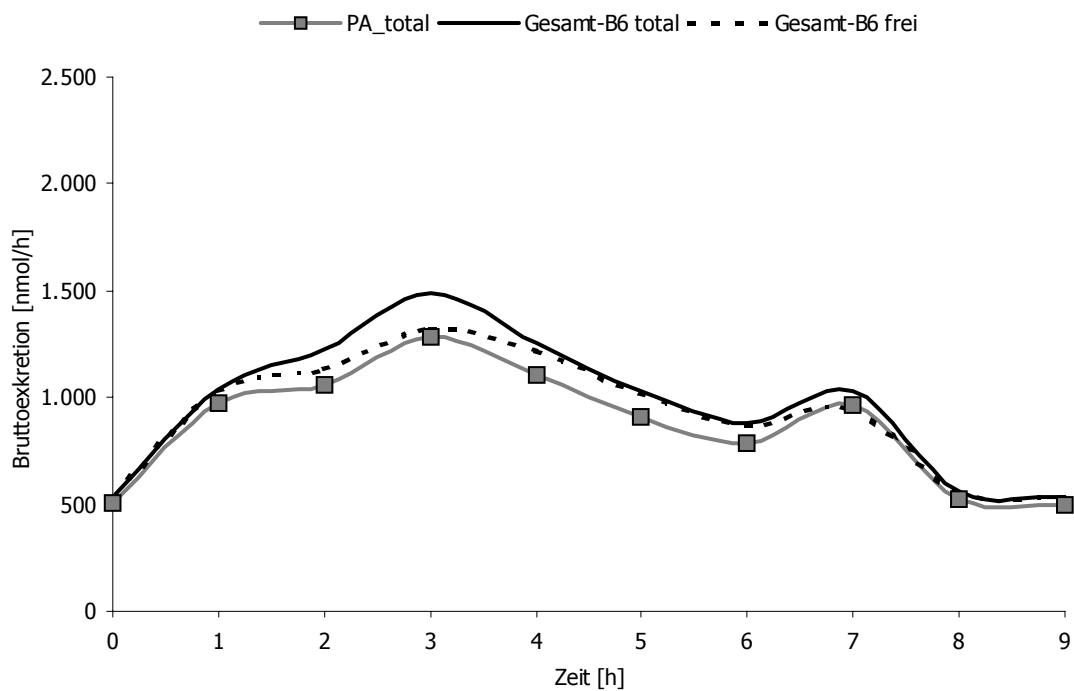


Diagramm 9 Testreihe_5: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_01; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



5

Diagramm 10 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—total, ...frei) je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_01; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

Die höchste Plasmakonzentration (*Werte siehe Tabellenteil*) wird im Mittel aller Probanden nach 126 min erreicht, die höchste Ausscheidung nach 3 Stunden.

10

Tabelle 13 Applizierte Mengen an Vitamin B6 in Testreihe 5

Versuchsperson	Trinkmenge [ml]	Vitamin B6 [nM]	appliziertes Vitamin B6 [nmol]	appliziertes Vitamin B6 [mg] berechnet als Pyridoxin-Hydrochlorid	davon gebundenes Vitamin B6
01	500	$14,56 \cdot 10^3$	7.280	1,48	50 %
02	500	$14,63 \cdot 10^3$	7.315	1,50	51 %
03	500	$14,56 \cdot 10^3$	7.280	1,48	50 %
04	500	$14,56 \cdot 10^3$	7.280	1,48	50 %
05	500	$14,63 \cdot 10^3$	7.315	1,50	51 %
06	500	$14,58 \cdot 10^3$	7.290	1,49	50 %
07	500	$14,58 \cdot 10^3$	7.290	1,49	50 %
08	500	$14,58 \cdot 10^3$	7.290	1,49	50 %
09	500	$14,63 \cdot 10^3$	7.315	1,50	51 %
10	500	$14,63 \cdot 10^3$	7.315	1,50	51 %
11	500	$14,58 \cdot 10^3$	7.290	1,49	50 %
12	500	$14,56 \cdot 10^3$	7.280	1,48	50 %

Die geringen Schwankungen des Vitamin B6-Gehaltes waren messtechnisch bedingt. Noch exakteres Auswiegen ($<10 \mu\text{g}$) liessen die zur Verfügung stehenden Laborwaagen nicht zu.

4.2.6. Testreihe 6

Diagramm 11 zeigt die Konzentrationen von PLP und Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson 01 nach intravenöser Verabreichung von 1,5 mg Pyridoxin-Hydrochlorid. Die Werte im Stundenurin für PA und <Vitamin B6+PA> sind in Diagramm 12 gezeigt; vollständige Datensätze siehe Anhang.

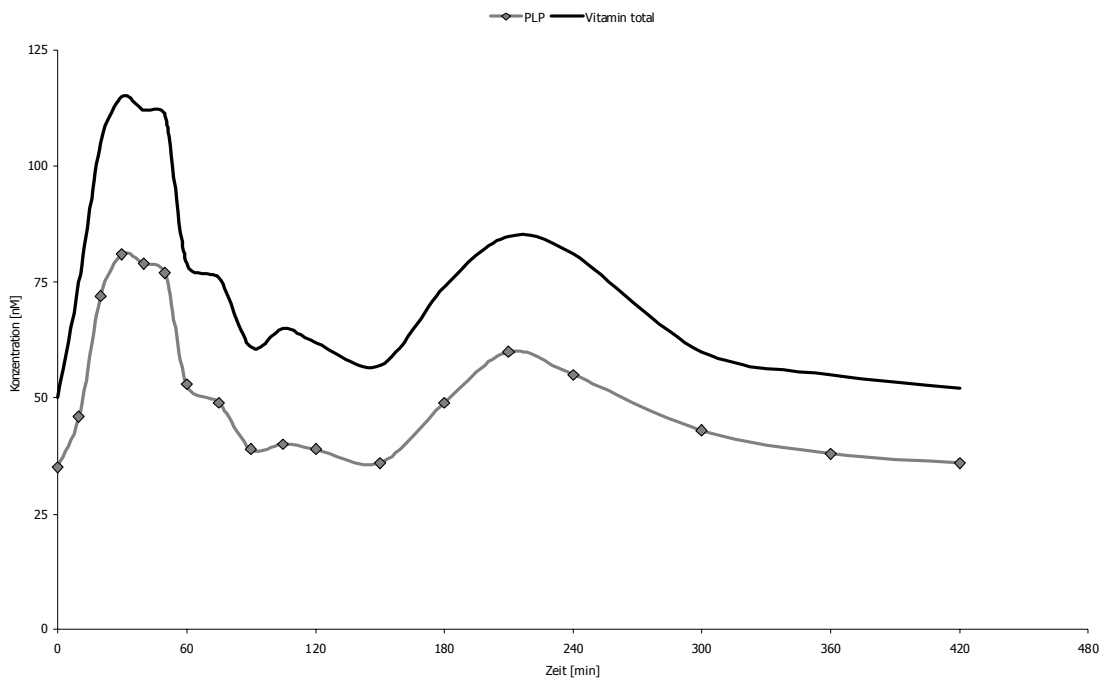


Diagramm 11 Testreihe_6: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_01; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nmol/l]

Die höchste gemessene Konzentration von totalem Vitamin B6 betrug 127 nmol/l ($t = 30$ min) und lag von $t = 20$ min bis 50 min bei ca. 120 nmol/l. Für die Hauptform PLP lag der Maximalwert bei 81 nmol/l ($t = 30$ min). Ein zweites, lokales Maximum wurde nach 3,5 h erreicht, totales Vitamin B6: 97 nmol/l, PLP: 60 nmol/l.

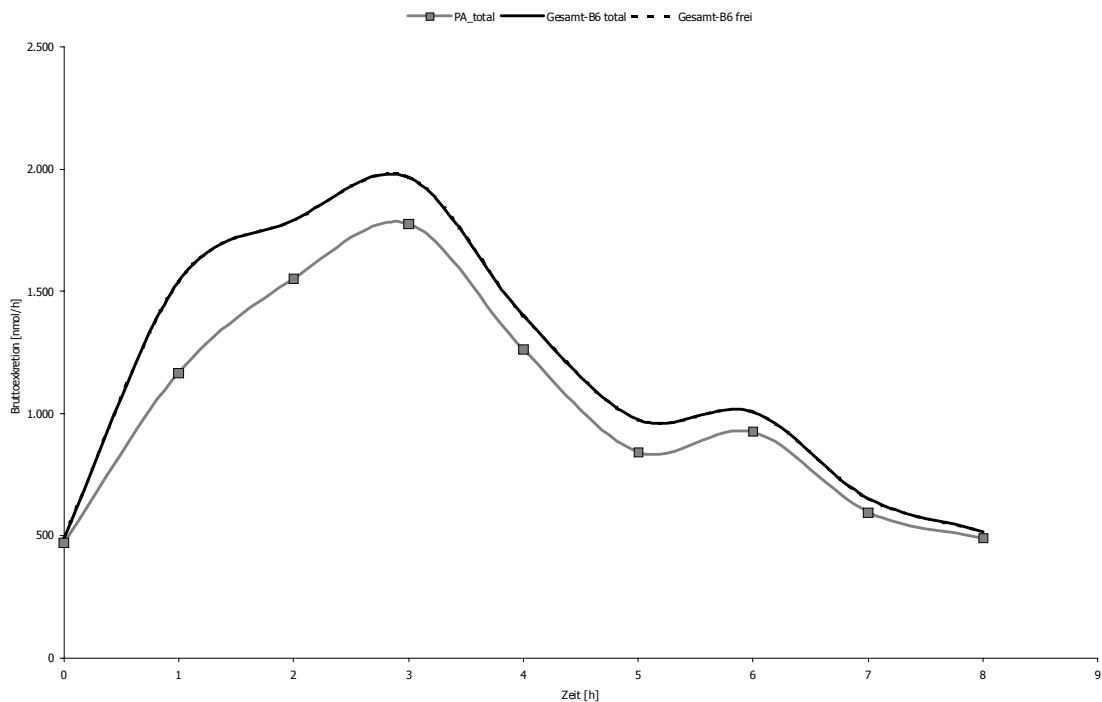


Diagramm 12 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—) je Stunde in Testreihe_6, Versuchsperson_01; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

Im Stundenurin wurde die Höchstmenge nach 3 h gemessen (PA: 1,78 μmol ; <Vitamin B6+PA>: 1,97 mmol). Die höchste Ausscheidung des verabreichten Vitamers Pyridoxin (374 nmol/h) wurde nach 1 h festgestellt (vgl. Tabelle 97), gefolgt von einem stetigen Abfall. Ein lokales Maximum nach 6 Stunden ist statistisch unbedeutend, d.h. es liegt ein stetiger Abfall vor.

4.3. Biokinetische Auswertungen

In diesem Abschnitt sind die Werte für die Versuchspersonen 01 bis 03 wiedergegeben. Die Werte der übrigen VP sind dem Anhang zu entnehmen.

4.3.1. Versuchsperson 01

- 5 Diagramm 13 zeigt im Zeitprofil die Nettoexkretionen von totalem <Vitamin B6+PA> nach den Testreihen 1 bis 5.

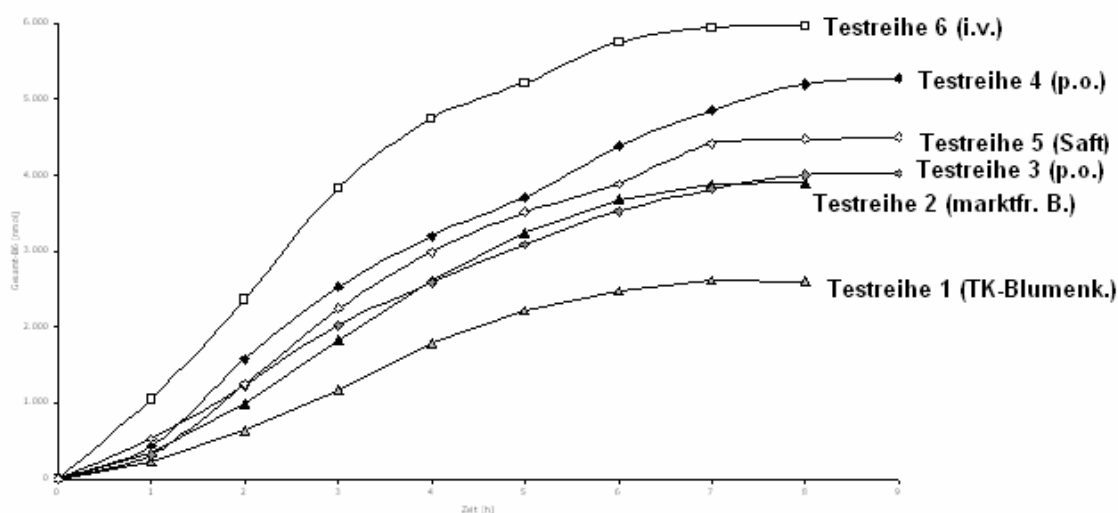


Diagramm 13 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_01 nach sechs Testreihen; x-Achse: Zeit [h], y-Achse: exkretierte Menge [nmol]

- 10 Die Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> in den ersten acht Stunden betrug nach i.v.-Applikation 6,0 μmol , nach p.o.-Applikation 5,2 μmol und nach Lebensmittelverzehr zwischen 4,5 und 2,6 μmol , weitere Daten siehe Tabellen-
teil. Nach Ablauf von acht Stunden wurde keine Zunahme der Nettoexkretion
mehr festgestellt.
- 15 In der Tabelle 14 sind biokinetische Parameter zusammengestellt, die mit Hilfe
eines mathematischen Zwei-Kompartiment-Modelles aus den Daten für (totales)
<Vitamin B6+PA> ermittelt wurden, zur Vereinfachung wurden die Kenngrößen
in gleiche Dimensionen umgewandelt. Die zugehörigen, im pharmakokineti-
schen Modell errechneten Verlaufskurven sind in Diagramm 14 bis Diagramm
20 wiedergegeben.

Tabelle 14 Biokinetische Parameter und Kenngrößen zur Modellzuverlässigkeit für Versuchsperson_01 in den durchgeführten Testreihen (T).

Parameter	T 1 (TK-B.)	T 2 (mfr.B.)	T 3 (p.o. prop.)	T 4 (p.o. 1,5mg)	T 5 (Saft)	T 6 (i.v.)
$T_{\max}$ [min]	85	93	60	67	110	29,4
$C_{\max}$ [nM]	47	50	70	76	53	74
AUC_{Modell} [nM·min]	8.800	11.000	8.500	12.000	14.000	15.000
b_1 [min^{-1}]	13	1,3	13	5,1	0,18	0,0383
b_2 [min^{-1}]	0,015	0,018	0,022	0,015	0,010	0,0014
k_{31} [min^{-1}]	0,18	0,44	12	4,3	0,18	0,0107
k_{1e} [min^{-1}]	1,1	0,052	0,024	0,018	0,010	0,0048
k_{13} [min^{-1}]	12	0,79	0,96	0,83	0,000017	0,0233
k_{01} [min^{-1}]	0,015	0,0094	0,022	0,021	0,010	
t_{lag} [min]	22	19	16	11	15	29,4
t-Wert (0,05)	13	13	13	2,3	2,2	2,2
Fehlerquadrat	64	210	170	540	3.300	5.300
B-Wert	0,99	0,97	0,99	0,98	0,96	0,74
SD	8,0	14	13	7,8	18	21
Akaike	41	49	48	110	140	160
Imbimbo	3,6	5,7	4,0	0,29	0,36	1,1

Im i.v.-Versuch wurde ein Verteilungsvolumen (V_{ss}) von 98 l (1,5 l/kg KG) errechnet.

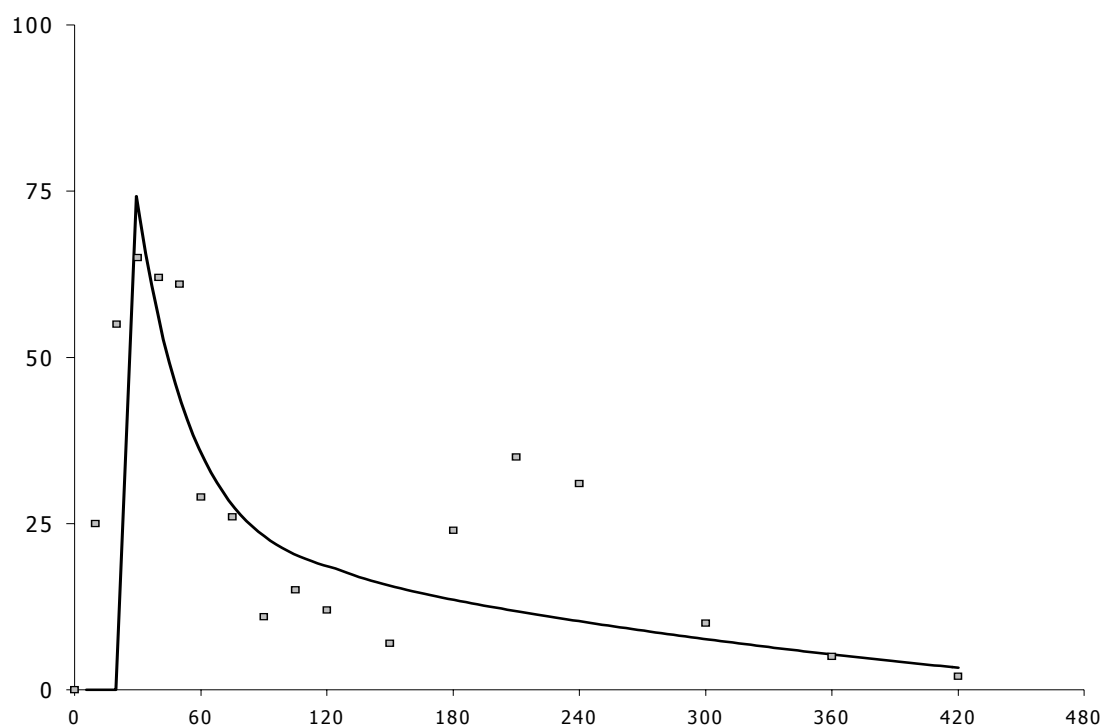
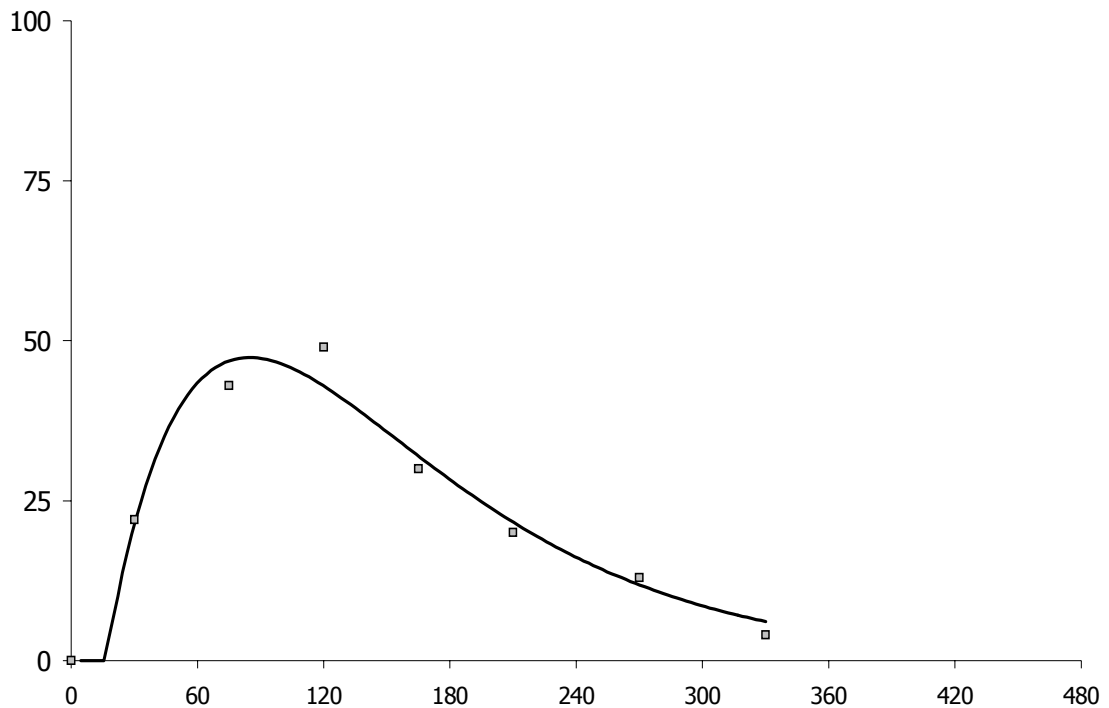


Diagramm 14 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_01, Testreihe_6; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

Nach der i.v.-Applikation zeigt die im 2-Kompartiment-Modell angepasste Kurve einen stetigen Abfall.



5 Diagramm 15 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_01, Testreihe_1; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

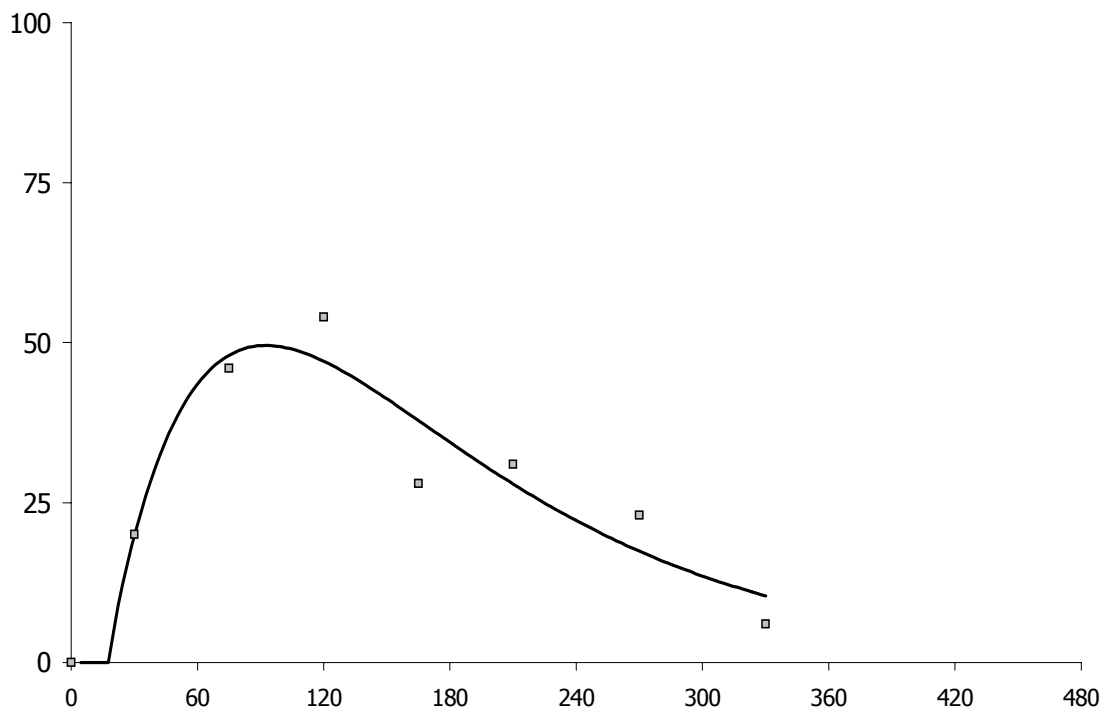


Diagramm 16 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_01, Testreihe_2; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

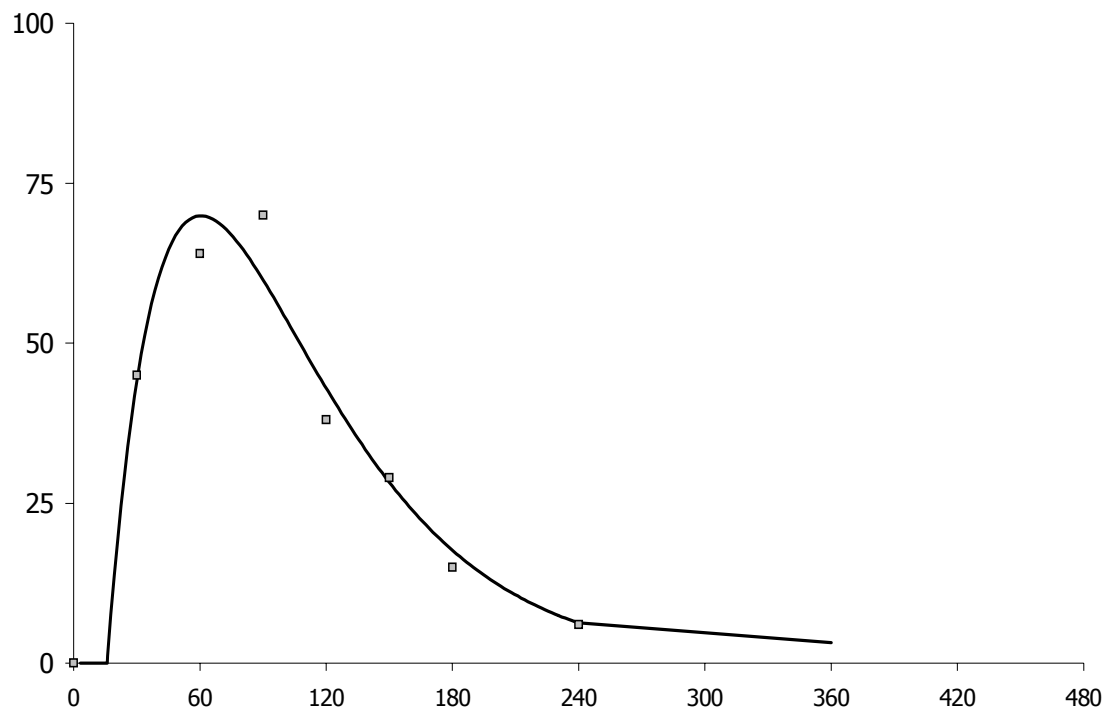
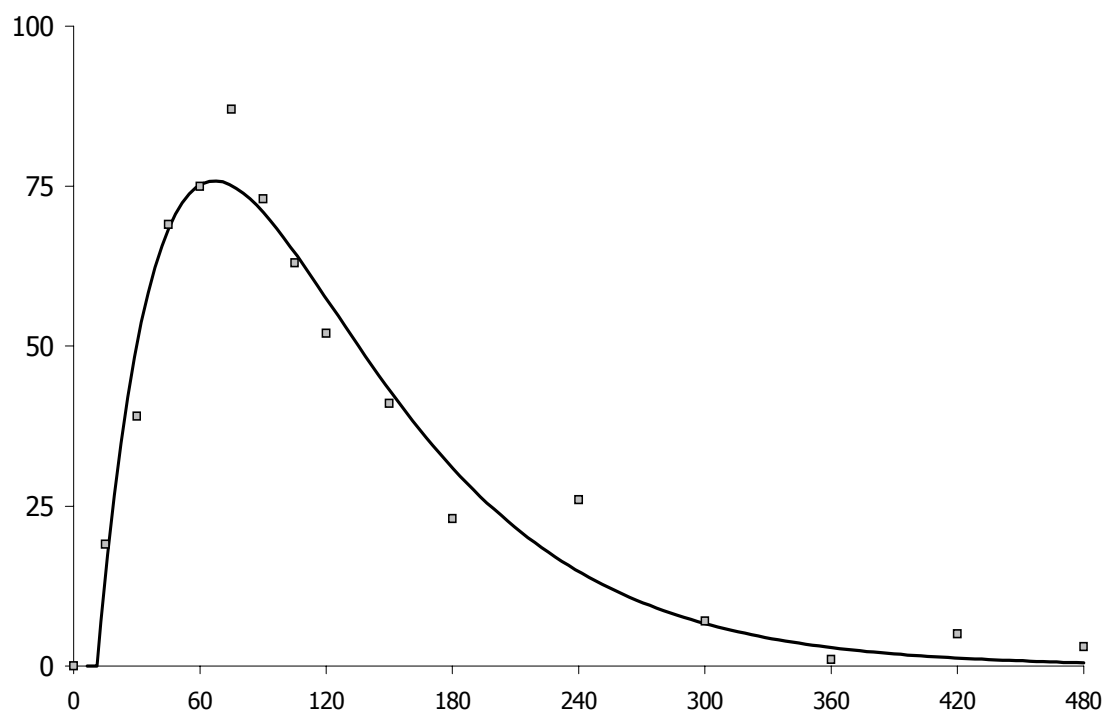


Diagramm 17 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_01, Testreihe_3; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]



5 Diagramm 18 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_01, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

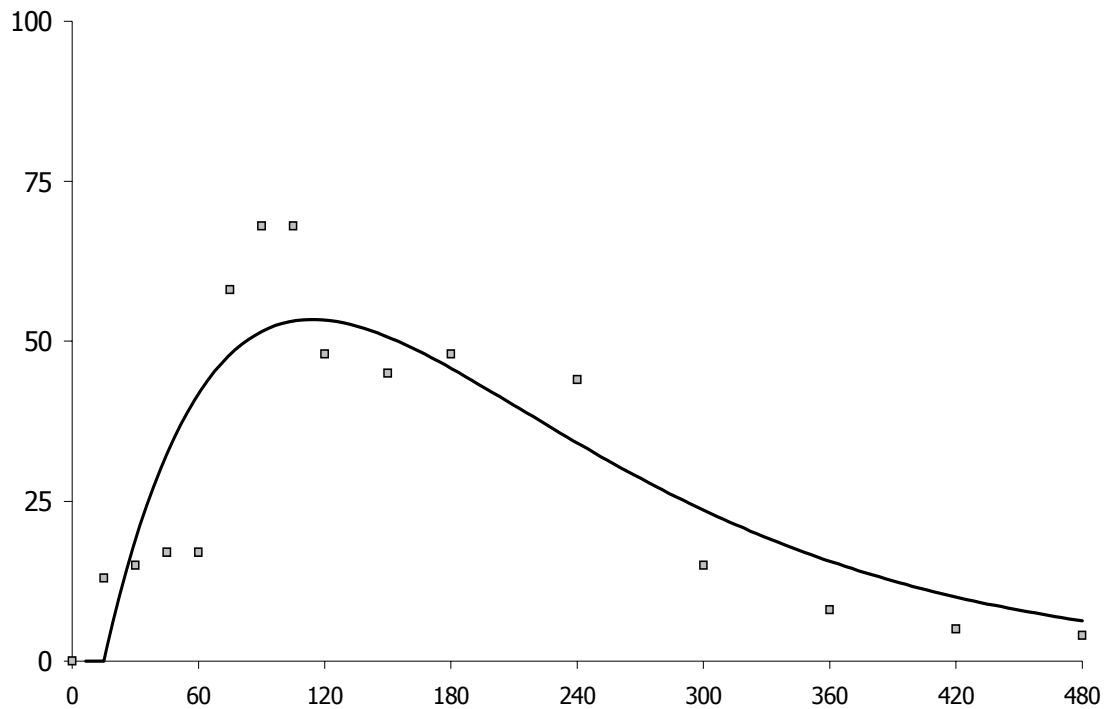


Diagramm 19 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_01, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

- Die angepassten Kurven nach oraler Applikation von Reinsubstanz oder Lebensmitteln zeigen jeweils eine deutlich Invasionsphase mit absolutem Maximum und anschliessender Evasionsphase.

4.3.2. Versuchspersonen 02 und 03

Diagramm 20 und Diagramm 21 zeigen im Zeitprofil die Nettoexkretionen von totalem <Vitamin B6+PA> nach den Testreihen 1 bis 5.

10

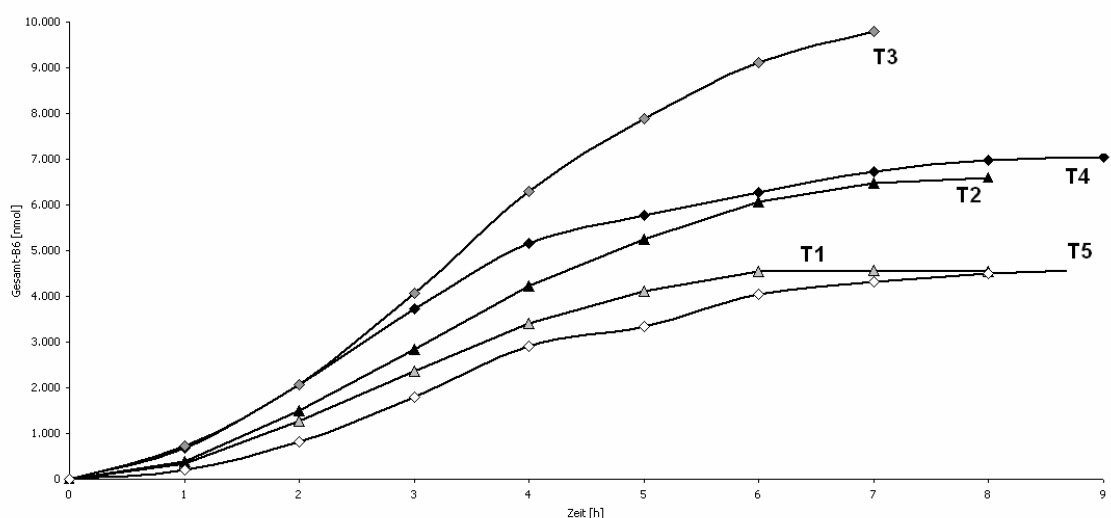
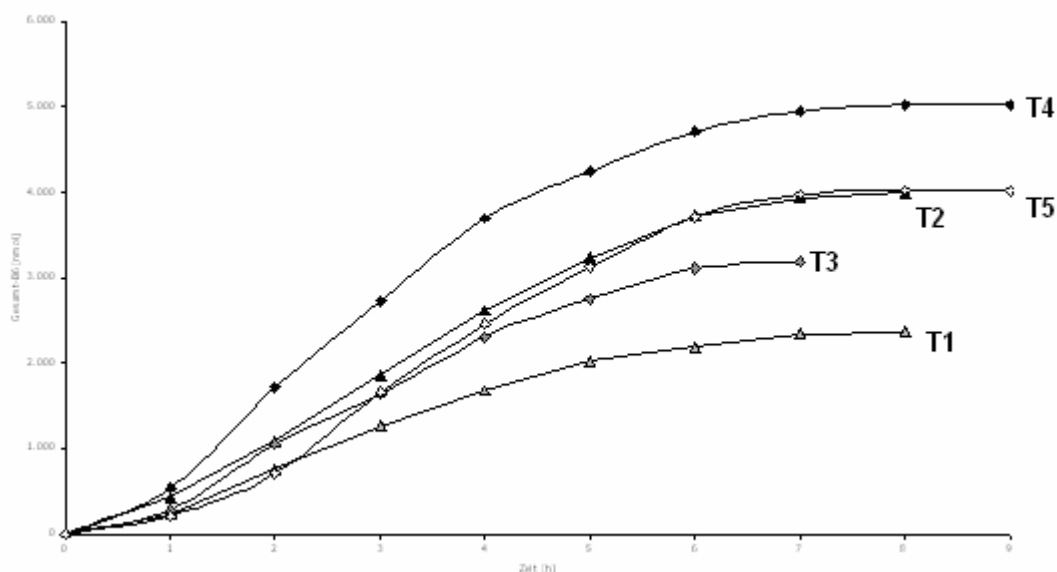


Diagramm 20 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_02 nach fünf Testreihen; x-Achse: Zeit [h], y-Achse: exkretierte Menge [nmol]



5 Diagramm 21 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_03 nach fünf Testreihen; x-Achse: Zeit [h], y-Achse: exkretierte Menge [nmol]

In der Tabelle 15 sind biokinetische Parameter zusammengestellt, die nach dem für VP 01 beschriebenen Verfahren ermittelt wurden. Die zugehörigen Verlaufskurven sind in Diagramm 22 bis Diagramm 31 wiedergegeben.

10

Tabelle 15 Biokinetische Parameter und Kenngrößen zur Modellzuverlässigkeit für Versuchspersonen (VP) 02 und 03 in den durchgeführten Testreihen (T).

Parameter	VP 02					VP 03				
	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5
$T_{\max}$ [min]	77	80	0,77	51	73	130	90	70	100	91
$C_{\max}$ [nM]	62	87	220	68	71	44	42	44	44	48
AUC_{Modell} [nM·min]	8.300	14.000	14.000	8.000	11.000	13.000	7.000	4.200	8.600	7.900
b_1 [min ⁻¹]	14	2,8	7,9	0,40	3,2	0,069	13	15	9,7	0,24
b_2 [min ⁻¹]	0,020	0,017	0,0070	0,11	0,036	0,0093	0,17	0,28	0,014	0,016
k_{31} [min ⁻¹]	12	2,4	0,0078	0,40	1,1	0,069	12	15	9,0	0,24
k_{1e} [min ⁻¹]	0,025	0,019	7,1	0,11	0,098	0,0093	0,018	0,28	0,015	0,016
k_{13} [min ⁻¹]	2,7	0,37	0,82	0,000017	2,0	0,000015	1,2	0,00028	0,61	0,00028
k_{01} [min ⁻¹]	0,020	0,017	0,018	0,011	0,011	0,0093	0,017	0,012	0,014	0,016
t_{lag} [min]	28	20	0,0010	28	26	18	29	59	29	30

Parameter	VP 02					VP 03				
	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5
t-Wert (0,05)	3,2	4,3	-	2,8	2,8	3,2	4,3	-	2,8	3,2
Fehlerquadrate	18	22	8,2	67	450	1.300	620	42	160	640
B-Wert	1,0	1,0	1,0	0,99	0,947	0,88	0,87	0,98	0,98	0,93
SD	2,4	3,3	-.	4,1	11	21	18	-	6,3	15
Akaike	38	37	23	54	73	77	63	31	63	70
Imbimbo	0,23	0,32	-.	0,39	0,76	1,8	3,8	-.	0,60	1,6

Die gezeigten Werte entstammen dem 2-Kompartiment-Modell und zeigen starke Ähnlichkeit zu den Werten von VP 01. Mittelwerte und Auswertungen siehe Abschnitt 4.3.3.

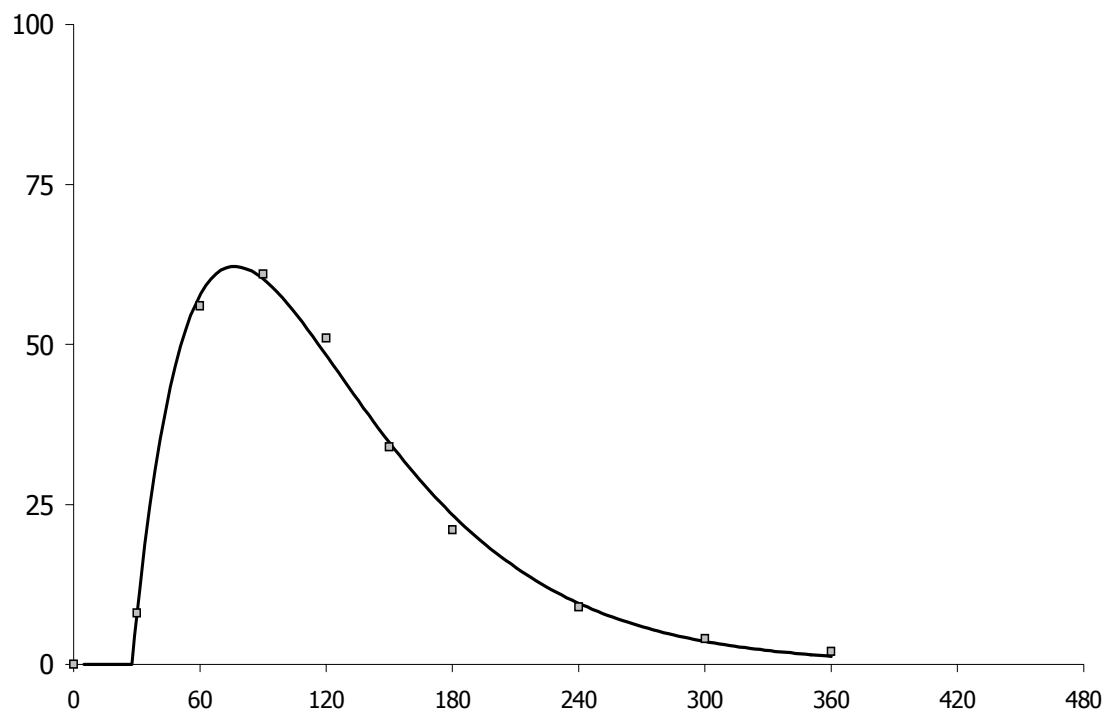


Diagramm 22 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_02, Testreihe_1; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

5

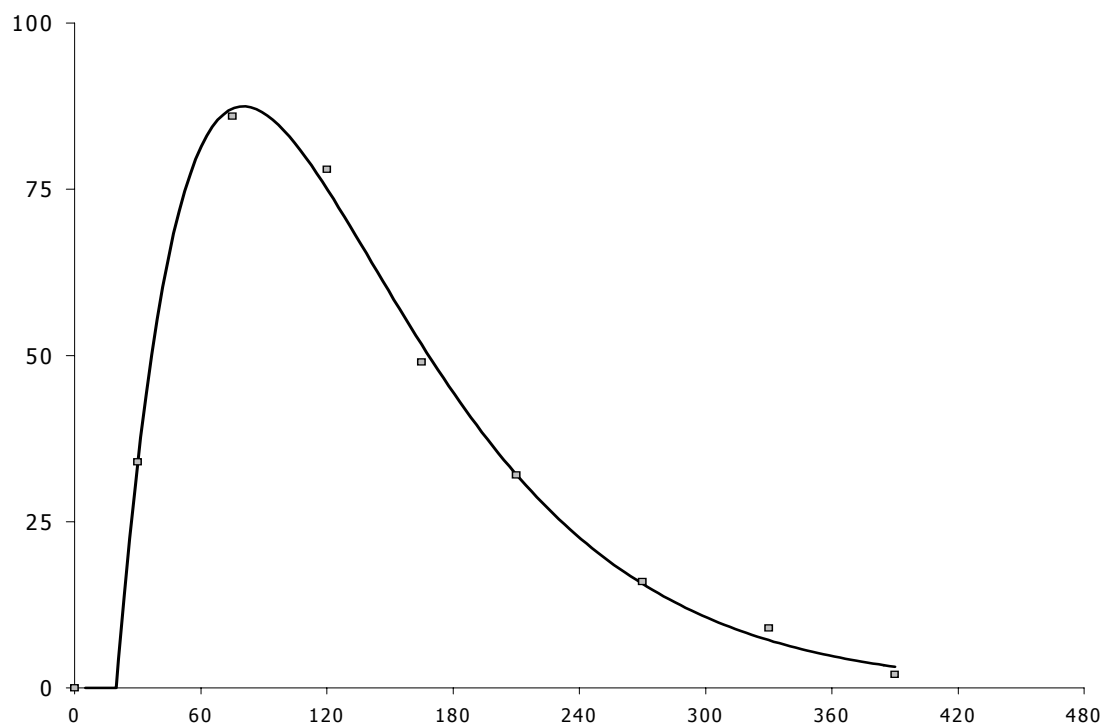


Diagramm 23 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_02, Testreihe_2; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

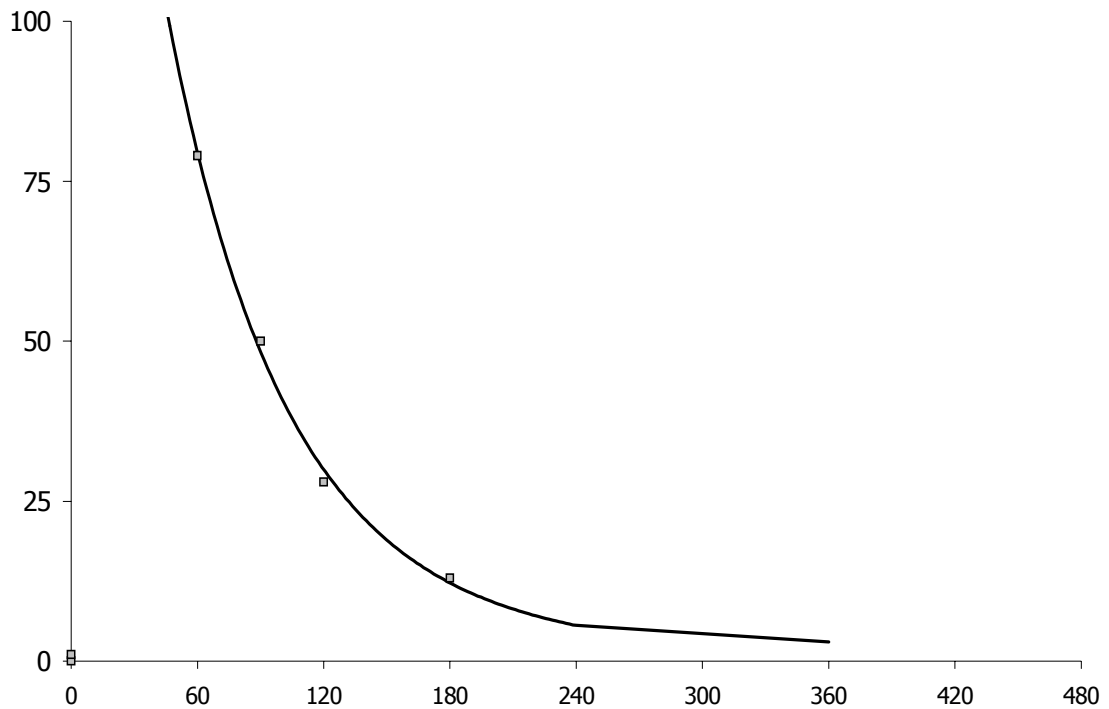


Diagramm 24 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_02, Testreihe_3; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

Die verwendete Software errechnete für Testreihe 3 (p.o. - prop. Dosisierung)

5 nur eine Eliminationskurve (vgl. Diskussion).

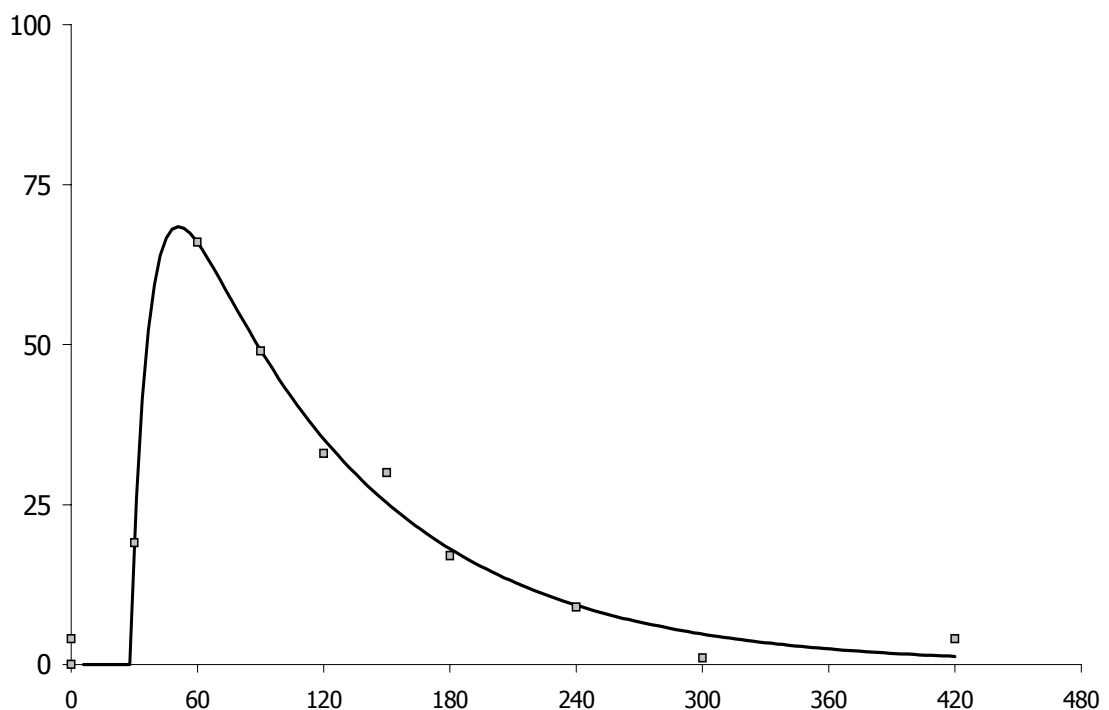


Diagramm 25 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_02, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

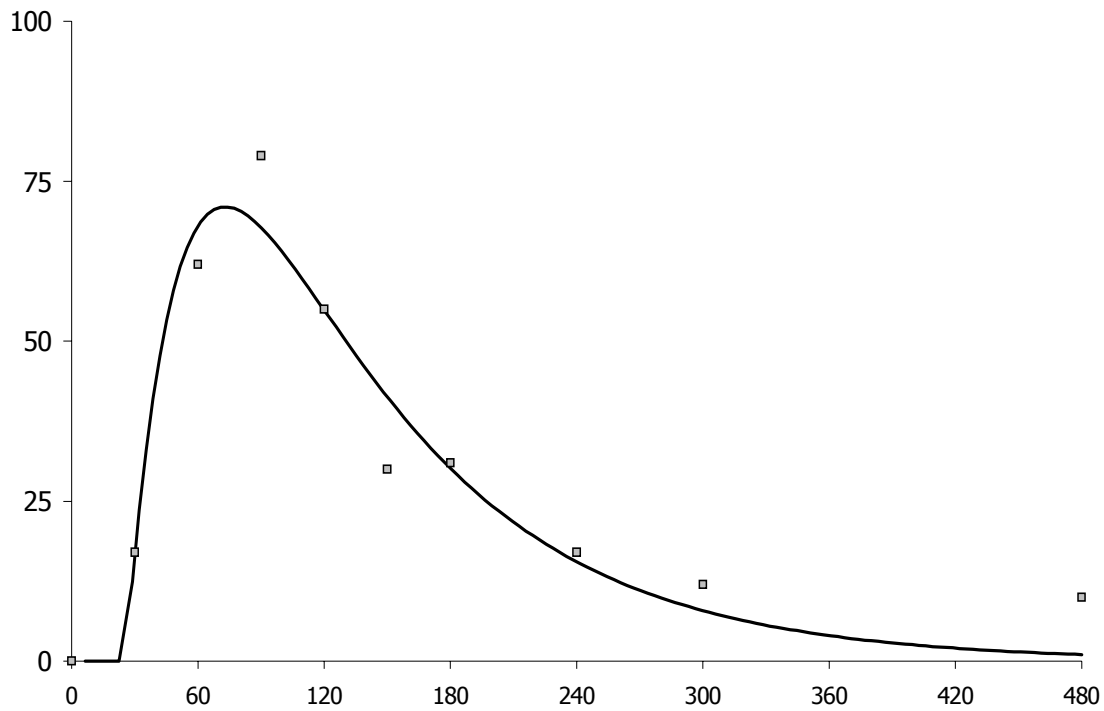
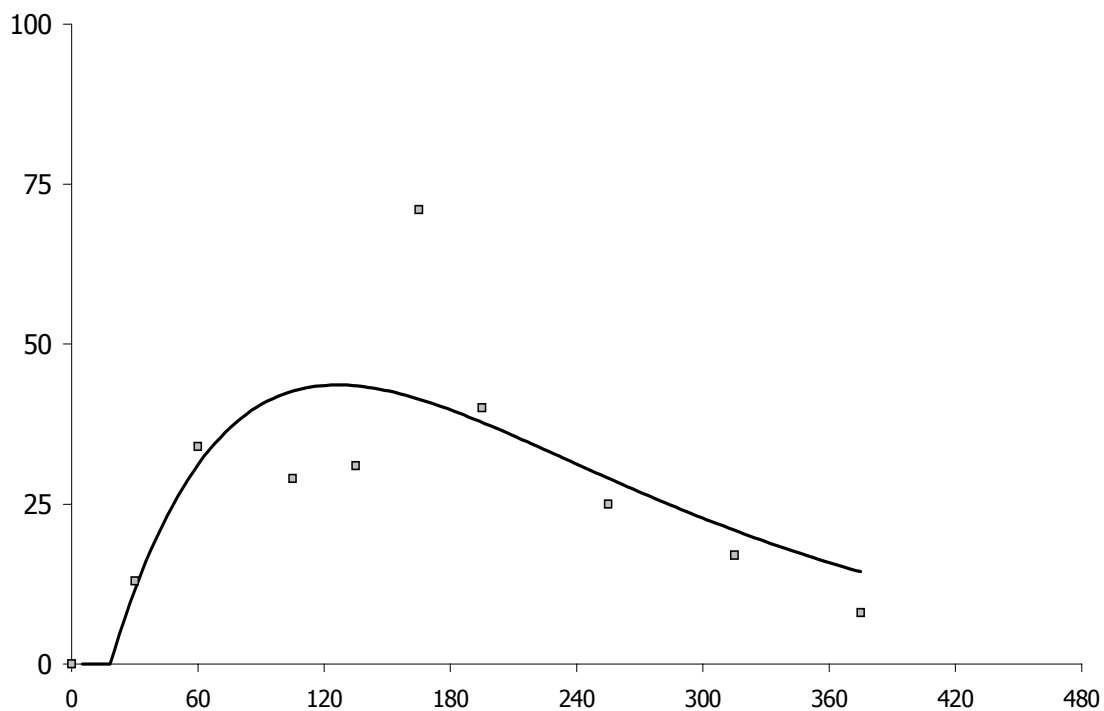


Diagramm 26 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_02, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]



5 Diagramm 27 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_03, Testreihe_1; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

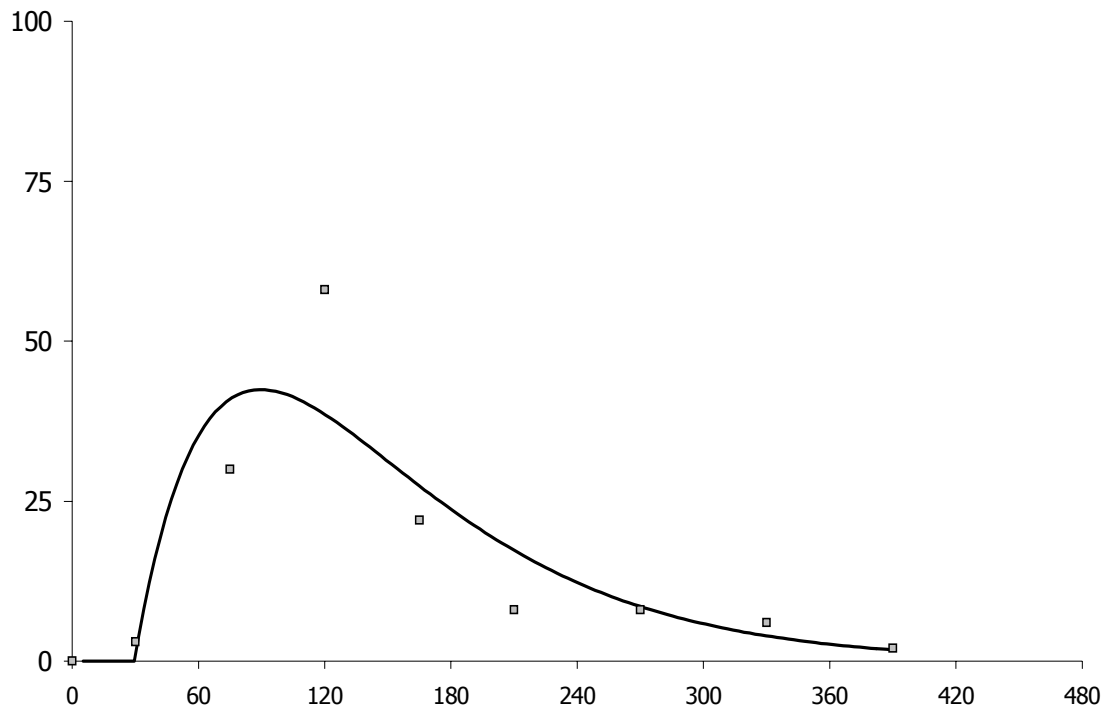
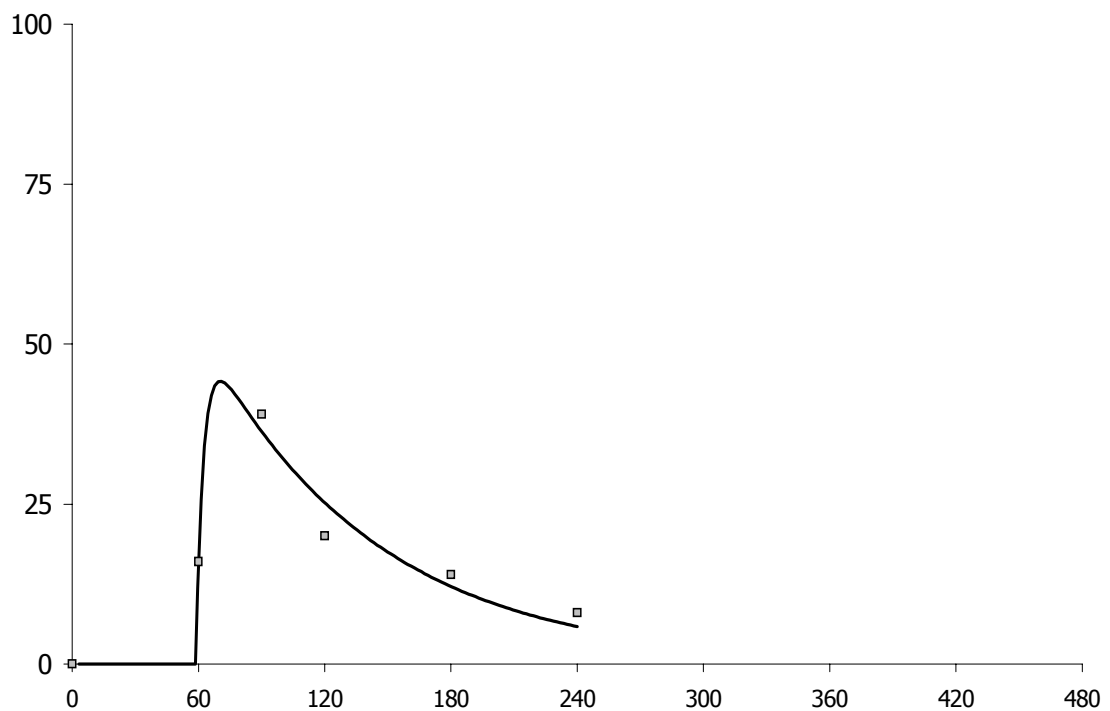


Diagramm 28 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_03, Testreihe_2; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]



- 5 Diagramm 29 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_03, Testreihe_3; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

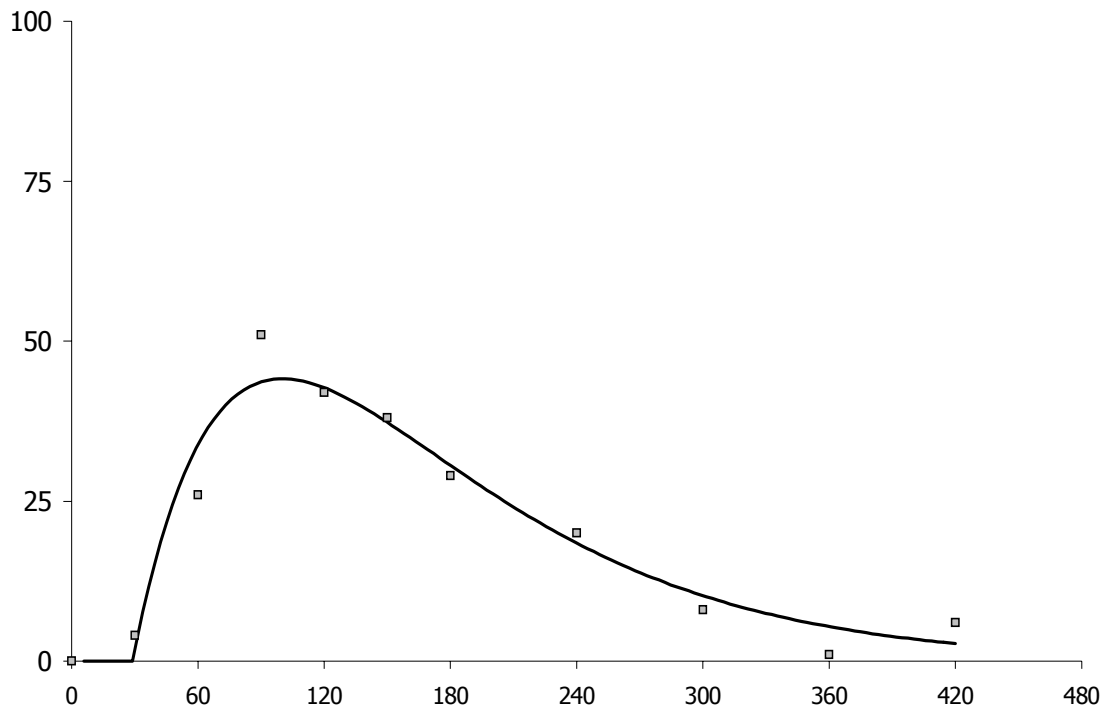
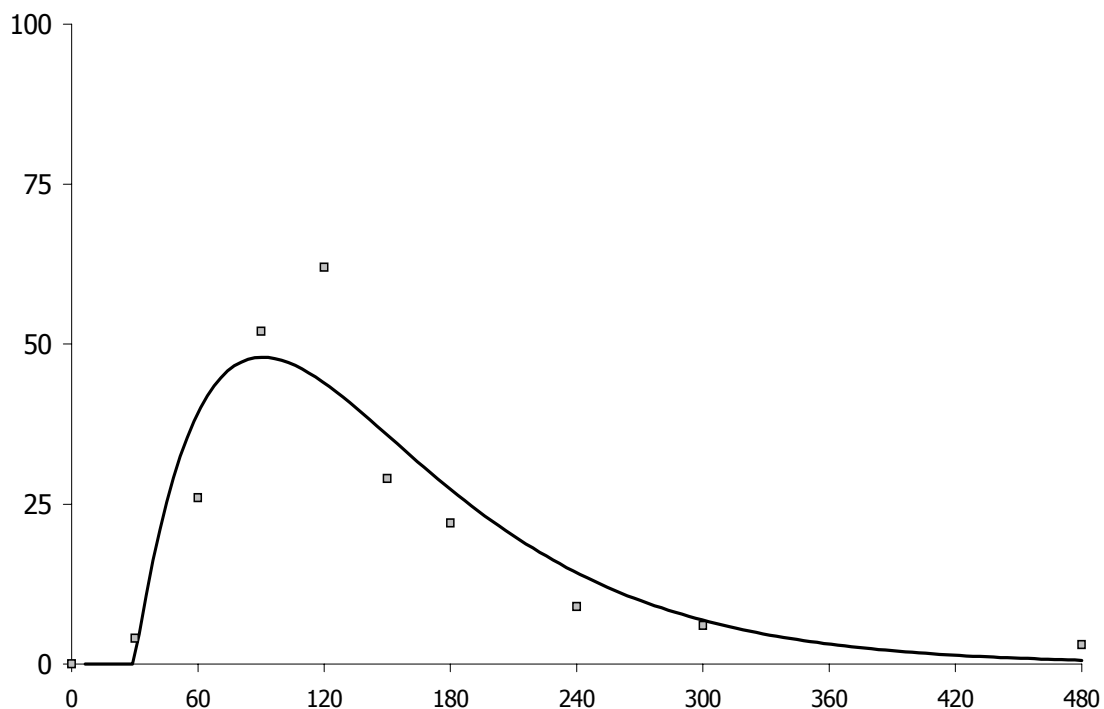


Diagramm 30 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_03, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]



- 5 Diagramm 31 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_03, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

Die angepassten Kurven der Versuchspersonen 02 und 03 weisen einen ähnlichen Verlauf wie bei Proband 01 auf, mit Ausnahme von Diagramm 24 (2 mg Reinsubstanz p.o. in Testreihe 3). Hier zeigt das Modell keine Invasionsphase, sondern nur eine stetige Elimination.

4.3.3. Mittelwerte

Einige Mittelwerte aus den vorstehenden Testreihen sind im Folgenden aufbereitet, weitere Daten werden im Anhang zusammengefasst.

4.3.3.1. Testreihen 4 und 5

- 5 In Tabelle 16 ff. sind für jede Versuchsperson ins Verhältnis gesetzt:
- a) Flächen unter den Netto-Plasmaspiegelkurven (totales Vitamin B6) aus den biokinetischen Modellen der Testreihen 4 (1,5 mg Reinsubstanz p.o.) und 5 (Karottensaft)
 - 10 b) nach dem gleichen Verfahren die Zeitpunkte [min] der höchsten Netto-Plasmakonzentration
 - c) die über neun Stunden gemessene Netto-Exkretion.

Tabelle 16 Vergleich der AUC aus Testreihe 4 (=100%) und 5, 2-Komp.-Modell von totalem Plasma-Vitamin B6 (Nettowerte).

AUC · 10 ³	Testreihe 4	Testreihe 5	relativ (T5/T4)
VP 01	12	14	117 %
VP 02	8,0	11	138 %
VP 03	8,6	7,9	92 %
VP 04	9,2	7,9	86 %
VP 05	8,2	13	159 %
VP 06	8,1	10	124 %
VP 07	10	15	150 %
VP 08	13	9,8	75 %
VP 09	11	12	109 %
VP 10	8,4	13	155 %
VP 11	9,1	13	143 %
VP 12	7,8	10	128 %

- 15 Mittelwert (T5/T4) aller Versuchspersonen: 122,8 % ± 27,8, ($p = 0,01^{40}$).

⁴⁰ gepaarter T-Test

Tabelle 17 Vergleich von T_{max} [min] aus Testreihe 4 (=100%) und 5, 2-Komp.-Modell von totalem Plasma-Vitamin B6.

T _{max}	Testreihe 4	Testreihe 5	relativ (T5/T4)
VP 01	67	110	164 %
VP 02	51	73	143 %
VP 03	100	91	91 %
VP 04	96	91	95 %
VP 05	89	110	124 %
VP 06	100	98	98 %
VP 07	98	140	143 %
VP 08	120	110	92 %
VP 09	95	110	116 %
VP 10	52	110	212 %
VP 11	89	120	135 %
VP 12	70	98	140 %

Mittelwert (T5/T4) aller Versuchspersonen: 129,3 % ± 35,4 (p = 0,006).

- 5 Tabelle 18 Vergleich der 9h-Nettoexkretionen von totalem Gesamt- B6 in Testreihe 4 (=100%) und 5

Netto-Exkretion	Testreihe 4	Testreihe 5	relativ (T5/T4)
VP 01	5.275	4.495	85%
VP 02	7.045	4.596	65%
VP 03	5.025	4.010	80%
VP 04	4.925	3.575	73%
VP 05	5.316	4.365	82%
VP 06	4.263	3.823	90%
VP 07	4.637	3.751	81%
VP 08	5.987	4.292	72%
VP 09	5.459	4.554	83%
VP 10	5.282	4.033	76%
VP 11	3.449	3.144	91%
VP 12	6.133	5.086	83%

Mittelwert (T5/T4) aller Versuchspersonen: 80,1 % ± 7,5 (p < 0,001).

- 10 Das folgende Konzentrations-Zeit-Profil zeigt die Mittelwerte von totalem Vitamin B6 im Plasma aller Probanden in den Testreihen 4⁴¹ und 5.

⁴¹ Versuchsdurchführung mit konstanter Dosis (1,5 mg).

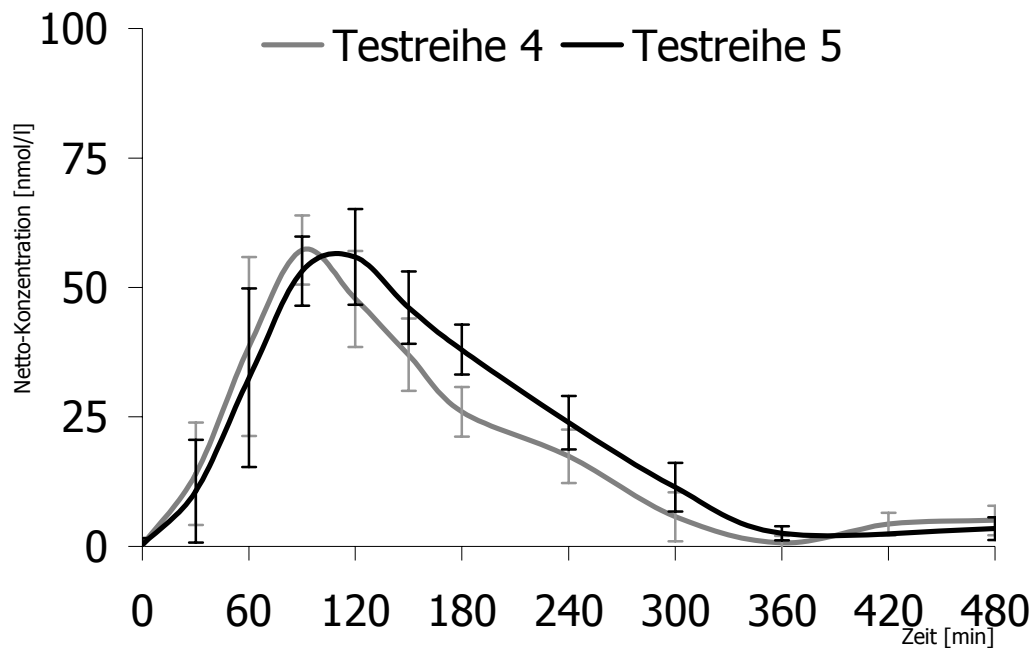


Diagramm 32: Vitamin B6 im Plasma nach Testreihe 4 bzw. 5. Mittelwert aller 12 Probanden. x-Achse: Zeit [min]; y-Achse: totales Netto-Vitamin B6 [nmol/l]

- Die Signifikanzprüfung für den Unterschied der Plasmawerte beider Testreihen ergab $p = 0,02$ ($t = 90-360$), d.h. 1,5 bis 6 Stunden nach Applikation des glucosidreichen Saftes werden signifikant höhere Vitamin B6-Plasmaspiegel erreicht als nach der gleichen Gesamtmenge Pyridoxin-Hydrochlorid.

4.3.3.2. Testreihen 1, 2 und 3

- Die Flächen unter den Plasmaspiegelkurven (totales Vitamin B6) aus den biokinetischen Modellen der Testreihen 1 (Tiefkühlblumenkohl), 2 (marktfrischer Blumenkohl) und 3 (Reinsubstanz, proportionale Dosierung) werden für jeden Versuchsteilnehmer verglichen:

Tabelle 19 Vergleich der AUC aus Testreihe 3 (=100%) sowie 1 und 2, 2-Komp.-Modell von totalem Plasma-Vitamin B6 (Nettowerte).

AUC · 10 ³	Test reihe 3	Test reihe 1	relativ (T1/T3)	Test reihe 2	relativ (T2/T3)	relativ (T1/T2)
VP 01	8,5	8,8	104 %	11	129 %	80 %
VP 02	14	8,3	60 %	14	100 %	59 %
VP 03	4,2	13	310 %	7,0	167 %	186 %

Der Mittelwert aller Versuchspersonen beträgt $157,4 \% \pm 133,5$ für das Verhältnis Testreihe 1 (TK-B.) zu 3 (p.o.) ($p \gg 0,05$) und $132,0 \% \pm 33,4$ ($p > 0,05$) für das Verhältnis Testreihe 2 (mfr.B.) zu 3 sowie $108,3 \% \pm 67,8$

($p \gg 0,05$) für das Verhältnis der beiden Blumenkohl-Testreihen 1 zu 2. Nach dem gleichen Verfahren sind im Folgenden die Zeitpunkte [min] der höchsten Plasmakonzentration in den gleichen Modellen zusammengestellt:

Tabelle 20 Vergleich von $T_{\max}$ [min] aus Testreihe 3 (=100%) sowie 1 und 2, 2-Komp.-Modell von totalem Plasma-Vitamin B6.

$T_{\max}$	Testreihe 3	Testreihe 1	relativ (T1/T3)	Testreihe 2	relativ (T2/T3)	relativ (T1/T2)
VP 01	60	85	142 %	93	155 %	91 %
VP 02	< 1 ⁴²	77	-	80	-	96 %
VP 03	70	130	186 %	90	129 %	144 %

Hier beträgt der Mittelwert der Versuchspersonen 1 und 3 $163,7 \% \pm 31,1$ für das Verhältnis Testreihe 1 (TK-B.) zu 3 (p.o.) ($p > 0,05$) und $141,8 \% \pm 18,7$ für das Verhältnis Testreihe 2 (mfr.B.) zu 3 ($p > 0,05$) sowie $110,7 \% \pm 29,3$ für das Verhältnis der beiden Blumenkohl-Testreihen 1 zu 2 (alle Probanden, $p > 0,05$ ⁴³). Schliesslich wird die gemessene Nettoexkretion über sieben Stunden verglichen:

Tabelle 21 Vergleich der 7h-Nettoexkretionen von totalem Gesamt- B6 in Testreihe 4 (=100%) sowie 2 und 3

Netto-Exkretion.	Testreihe 3	Testreihe 1	relativ (T1/T3)	Testreihe 2	relativ (T2/T3)	relativ (T1/T2)
VP 01	3.815	2.611	68%	3.883	102%	67%
VP 02	9.785	4.574	47%	6.475	66%	71%
VP 03	3.184	2.338	73%	3.935	124%	59%

Der Mittelwert aller Versuchspersonen beträgt $62,9 \% \pm 14,2$ für das Verhältnis Testreihe 1 (TK-B.) zu 3 (p.o.) und $97,2 \% \pm 29,0$ für das Verhältnis Testreihe 2 (mfr.B.) zu 3 sowie $65,8 \% \pm 5,8$ für das Verhältnis der beiden Blumenkohl-Testreihen 1 zu 2, p jeweils $> 0,05$.

4.3.4. Bioverfügbarkeit

4.3.4.1. Versuchsperson 01

Die Flächen unter den Plasmaspiegelkurven (totales Vitamin B6) aus den obenstehend erläuterten biokinetischen Modellen wird zur jeweils applizierten Dosis

⁴² Im Kinetischen Modell stark von den anderen Probanden/Testreihen abweichender Kurvenlauf.

⁴³ $p = 0,03$ ohne Berücksichtigung von VP 02

in Verhältnis gesetzt, zur Veranschaulichung wird der für Testreihe 6 (i.v.-Applikation) ermittelte Wert zur Bezugsgrösse (100 %), die Werte sind in Diagramm 33 dargestellt. Eine ähnliche Berechnung lässt sich für das Verhältnis von Netto-Exkretion und applizierter Menge aufstellen, diese Werte sind in

5 Diagramm 34 aufgeführt.

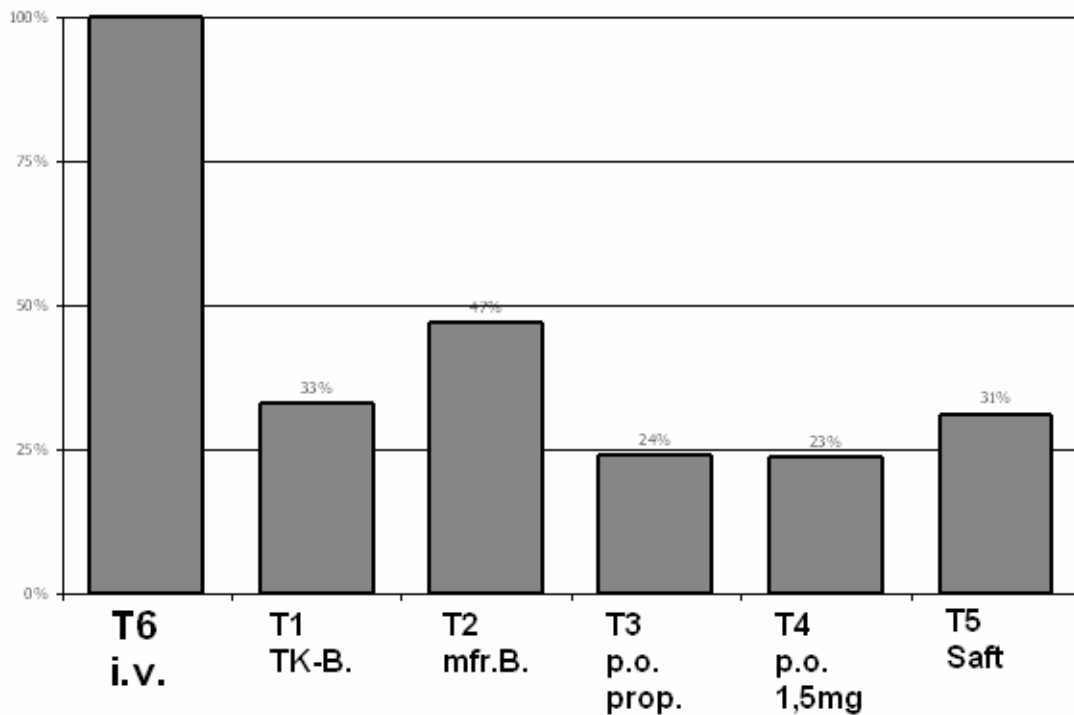


Diagramm 33 Bioverfügbarkeit bei Versuchsperson_01, berechnet über Plasma-AUC, Testreihe (T) 6 (i.v.-Applikation) als 100% gesetzt

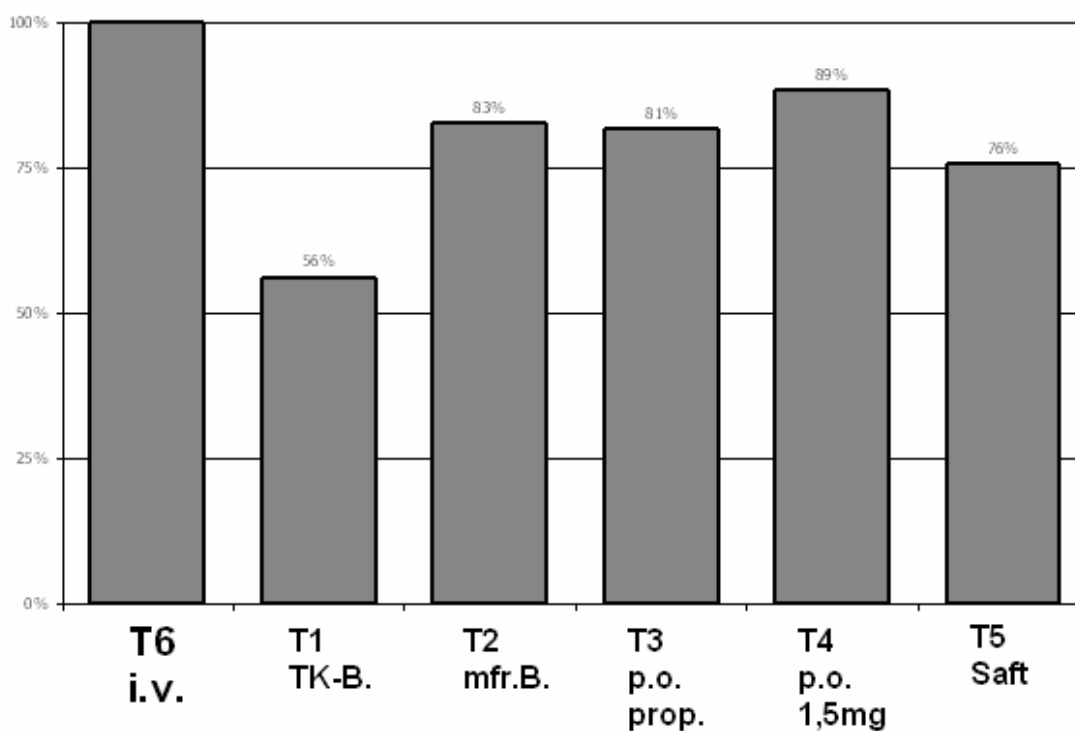


Diagramm 34 Bioverfügbarkeit bei Versuchsperson_01, berechnet über Netto-Exkretion, Testreihe (T) 6 (i.v.-Applikation) als 100% gesetzt

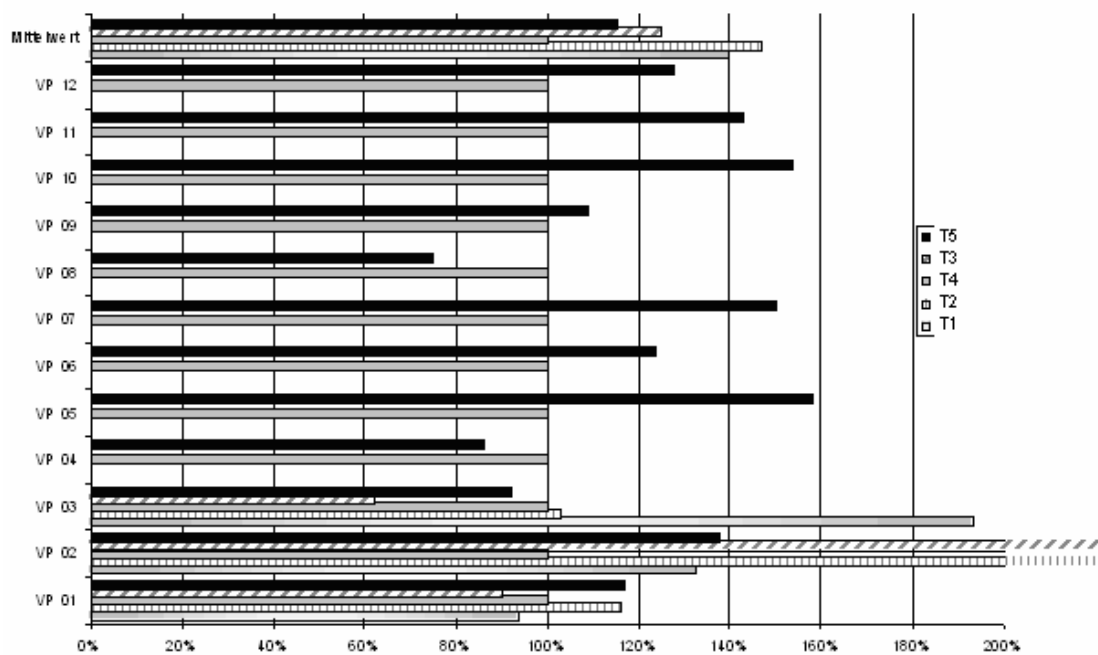
- 5 Unter Ausserachtlassung von Testreihe 3 (vgl. Kapitel Diskussion) ergibt sich somit eine positive Korrelation zwischen freiem Pyridoxin in der Testmahlzeit und der Bioverfügbarkeit. Eine Signifikanzprüfung bei $n=1$ ist statistisch nicht sinnvoll.

4.3.4.2. alle Versuchspersonen

- 10 Ähnlich wie im vorstehenden Abschnitt lassen sich auch Verhältnisrechnungen durchführen bezogen auf die orale Verabreichung von 1,5 mg Reinsubstanz (Testreihe 4). Tabelle 22 zeigt die Werte im Plasma (AUC), Tabelle 23 diejenigen für die Netto-Exkretion. Zur Verdeutlichung sind die Werte beider Tabellen zusätzlich als Balkendiagramme dargestellt.

Tabelle 22 Relative Bioverfügbarkeit, berechnet über Plasma-AUC (Nettowerte), Testreihe (T) 4 (orale Reinsubstanz) für jede Versuchsperson (VP) einzeln als 100% gesetzt.

	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5
VP 01	94 %	116 %	90 %	100 %	117 %
VP 02	133 %	222 %	222 %	100 %	138 %
VP 03	193 %	103 %	62 %	100 %	92 %
VP 04				100 %	86 %
VP 05				100 %	158 %
VP 06				100 %	124 %
VP 07				100 %	150 %
VP 08				100 %	75 %
VP 09				100 %	109 %
VP 10				100 %	154 %
VP 11				100 %	143 %
VP 12				100 %	128 %
Mittelwert	139,9 %	146,9 %	124,9 %		115,6 %
± SD	50,2	65,0	85,7		22,9
p	> 0,05	> 0,05	> 0,05		< 0,001

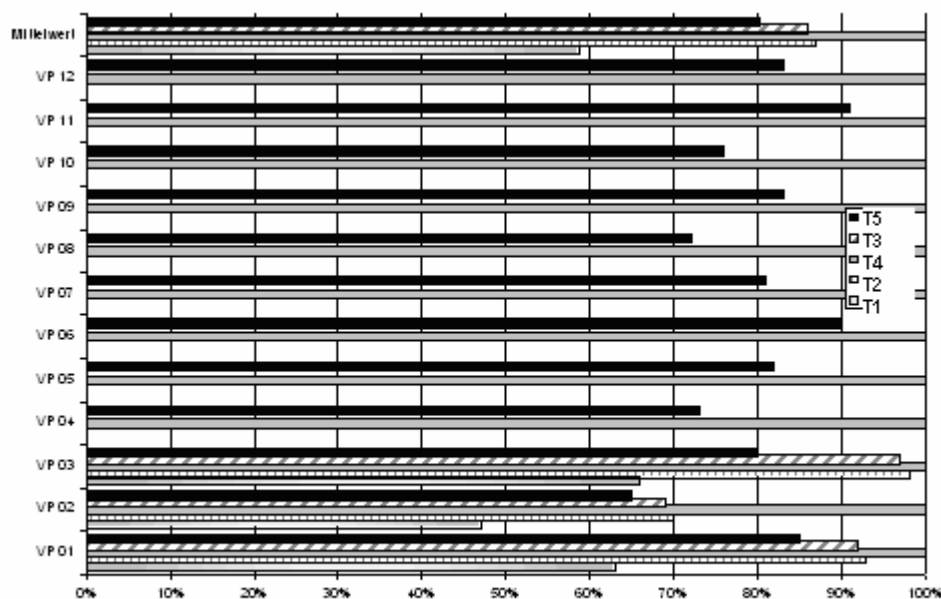


5

Abbildung 6: Relative Bioverfügbarkeit, Erläuterungen siehe vorstehende Tabelle

Tabelle 23 Relative Bioverfügbarkeit, berechnet über Netto-Exkretion, Testreihe (T) 4 (orale Reinsubstanz) für jede Versuchsperson (VP) einzeln als 100% gesetzt.

	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5
VP 01	63 %	93 %	92 %	100 %	85 %
VP 02	47 %	70 %	69 %	100 %	65 %
VP 03	66 %	98 %	97 %	100 %	80 %
VP 04				100 %	73 %
VP 05				100 %	82 %
VP 06				100 %	90 %
VP 07				100 %	81 %
VP 08				100 %	72 %
VP 09				100 %	83 %
VP 10				100 %	76 %
VP 11				100 %	91 %
VP 12				100 %	83 %
Mittelwert	58,7 %	87,0 %	86,0 %		80,1 %
± SD	10,2	14,9	14,9		7,5
p	0,01	> 0,05	> 0,05		< 0,001



5

Abbildung 7: Relative Bioverfügbarkeit, Erläuterungen siehe vorstehende Tabelle

Unter Anwendung der in Abschnitt 3.3.3.4 erläuterten Gleichung können für die Bioverfügbarkeit der gebundenen B6-Formen Aussagen anhand der Netto-Exkretionen getroffen werden, dabei werden die Berechnungen für jede Versuchsperson individuell durchgeführt. BV_{frei} wird aus Testreihe 4 (1,5 mg Reinsubstanz p.o.) herangezogen.

10

Tabelle 24 Relative Bioverfügbarkeit der gebundenen B6-Formen. Erläuterung der Variablen siehe Gleichung xx.

	BV _{frei}	Testreihe 1			Testreihe 2			Testreihe 5		
		BV _{Probe}	b	BV _{gebunden}	BV _{Probe}	b	BV _{gebunden}	BV _{Probe}	b	BV _{gebunden}
VP 01	0,723	0,457	0,538	0,230	0,673	0,27	0,540	0,617	0,50	0,511
VP 02	0,965	0,479	0,584	0,133	0,680	0,30	0,015	0,628	0,51	0,304
VP 03	0,688	0,447	0,538	0,240	0,728	0,27	0,833	0,550	0,50	0,412
VP 04	0,675							0,491	0,50	0,307
VP 05	0,728							0,596	0,51	0,470
VP 06	0,584							0,524	0,50	0,464
VP 07	0,635							0,514	0,50	0,393
VP 08	0,820							0,588	0,50	0,357
VP 09	0,748							0,622	0,51	0,502
VP 10	0,724							0,551	0,51	0,385
VP 11	0,472							0,431	0,50	0,340
VP 12	0,840							0,698	0,50	0,556
MW	71,7%	46,2%	55,3	20,1	69,4%	28,0	46,3	56,8%	50,3	42,1
± SD	12,6	1,6	2,7	5,9	2,9	1,7	41,5	7,2	0,5	8,0

Hierbei ergeben sich folgende Signifikanzen: Vitamin B6-Bioverfügbarkeit der Probe (BV_{Probe}) in der beiden Blumenkohl-Testreihen 1 zu 2: $p = 0,005$, Bioverfügbarkeit der gebundenen Anteile (BV_{gebunden}): $p > 0,05$.

- 5 BV_{Probe} in Testreihe 4 (p.o. 1,5mg) zu Testreihe 5 (Saft): $p < 0,001$, BV_{Probe} in Testreihe 1 zu Testreihe 5: $p = 0,008$ für VP 01 bis 03 (gepaarter T-Test) und $p = 0,01$ für alle VP (ungepaarter T-Test), die Werte für Testreihe 2 zu 5 lauten $p > 0,05$ (VP 01 bis 03) und $p = 0,006$ (alle VP).

- 10 BV_{gebunden}: Testreihe 1 (TK-B.) zu 5 (Saft) $p = 0,01$ (VP 01 bis 03) und $p < 0,001$ (alle VP); Testreihe 2 (mfr.B.) zu 5 $p > 0,05$ für beide Berechnungen.

Dieser und der vorangehende Abschnitt zeigen eine negative Korrelation zwischen dem PNG-Gehalt einer Testmahlzeit und der B6-Bioverfügbarkeit (BV). Dieser Zusammenhang ist jedoch nicht linear, sondern die BV fällt mit steigendem PNG-Gehalt überproportional ab.

5. Diskussion

5.1. Methoden

Ziel der Methodenentwicklung war eine möglichst wenig aufwändige HPLC-Methode mit online-Derivatisierung und monochromatischer Fluoreszenz-Detektion zur Verfügung zu stellen, mit der es möglich sein sollte, mit demselben Verfahren Messungen sowohl im Lebensmittel (fest und flüssig) als auch in Blut und Urin durchführen zu können. Dabei sollten die Effekte der systemischen Fehler minimiert werden, die sich zwangsläufig bei Vergleich von Werten ergeben, die mit verschiedenen Messverfahren in verschiedenen Matrices gewonnen wurden.

Eine solche "Universal-Methode", die unverändert auf ihrem Charakter nach unterschiedliche Probensubstanzen angewendet wird und die ein möglichst breites Spektrum von B6-Formen mit zum Teil recht widersprüchlichen physikochemischen Eigenschaften erfassen soll, wird notwendigerweise in einzelnen Aspekten (z.B. Bestimmungsgrenzen eines Vitamers) einer höher spezifischen Methode unterlegen sein. Aber eine solche "Universal-Methode" wird dann erfolgreich eingesetzt werden können, wenn es gelingt, in jedem einzelnen Aspekt – wenn schon nicht optimale, so doch hinreichend exakte – Ergebnisse zu liefern und damit eine genaue Vergleichbarkeit verschiedener Vitamin B6-Gehalte zu ermöglichen. Hingegen würde eine Anwendung von verschiedenen Messverfahren zwar für die jeweils optimalen Bedingungen noch präzisere bzw. noch "richtigere" Ergebnisse liefern. Jedoch sobald diese optimierten Messbedingungen nicht mehr erfüllt sind, z.B. durch ein anderes Untersuchungsmaterial, entweder wesentlich ungenauere Ergebnisse erzielen oder aber es müsste doch eine wesentlich veränderte Methodik zur Anwendung kommen, wodurch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht mehr gegeben wäre. In diesem Abschnitt ist nun zu untersuchen, ob die entwickelte bzw. modifizierte Methodik den oben skizzierten Ansprüchen genügt:

5.1.1. Nüchternwerte

Die folgende Tabelle stellt die in dieser Arbeit ermittelten (Nüchtern-)Konzentrationen an B6-Formen im Plasma Werten aus Untersuchungen mit vergleichbaren Techniken gegenüber.

Tabelle 25 Plasmanüchternwerte aus verschiedenen Untersuchungen

Untersuchung	Pro- banden	PLP [nmol/l]	"B6" [nmol/l]	"B6" ermittelt als
1 Lui et al. 1985 [83] ⁴⁴	9	29,5 ± 6,0	43,1	PLP (68%) + PMP PL PM PN
2 Thakker et al. 1987 [136] ⁴⁵	12 m ⁴⁶	44,1 ± 29,1	67,8	PLP (65%) + PL
3 Hirose et al. 1990 [67] ⁴⁷	7	69,0 ± 25,5	97,1	PLP (71%) + PMP PNP PL PM PN
4 Chrisley et al. 1991 [24] ⁴⁸	28 w	88 ± 18	197	PLP (45%) + PMP PNP PL PM PN
5 Speitling 1991 [131] ⁴⁹	9	80,5 ± 35	118	PLP (68%) + PMP PL PM PN
6 Sharma et al. 1992 [123] ⁵⁰	8	80 ± 21	193,5 ⁵¹	PLP (41%) + PMP PNP PL PM PN
7 Kimura et al. 1996 [74] ⁵²	3 m	18,6 ± 9,3	28,8	PLP (65%) + PMP PL PM PN
8 Hiraoka et al. 2001 [66] ⁵³	150 w	n.a.	70,3 ± 58,1	Summe aus PLP PMP PNP PL PM PN
9 <i>eigene</i>	12 m/w ⁵⁴ nur 6 m ⁵⁵ nur 6 w ⁵⁶	36,2 ± 3,2 38,7 ± 2,2 33,7 ± 3,7	47,0 ± 3,5 50,3 ± 2,0 43,8 ± 4,6	PLP (77%) + PMP PL PM PN

- Die Werte zeigen zunächst eine gute Übereinstimmung innerhalb der Methoden mit prinzipiell ähnlicher HPLC-Technik (z.B. 7 und 9). Deutlich werden aber auch einige Unterschiede, insbesondere die insgesamt höheren Vitamin B6-Spiegel bei einigen Arbeiten (3-6). Hierfür kommen zwei grundsätzliche Erklärungsansätze in Frage: Zum einen unterschiedliche Ergebnisse aufgrund der Eigenarten der jeweiligen Methodik und zum anderen aufgrund der deutlich verschiedenen Probandenauswahl.

⁴⁴ Methode Coburn/Mahuren (Bisulfit, Nachsäulenderivatisierung)

⁴⁵ Methode Gregory 1985 (Semicarbazid), in Quelle unrichtig(?) als Gregory 1986 (Rat Bioassay) zitiert.

⁴⁶ Für jeden Probanden an 3 Tagen ermittelt (= 36 Bestimmungen).

⁴⁷ Methode Tsuge (KCN)

⁴⁸ Methode basierend auf Pierotti (Dephosphorylierung)

⁴⁹ Methode Möller/Bitsch-R (Bisulfit, Nachsäulenderivatisierung)

⁵⁰ Methode basierend auf Gregory

⁵¹ davon 90 nmol/l PL

⁵² online-Derivatisierung mit Bisulfit

⁵³ Methode Edwards (Bisulfit, Nachsäulenderivatisierung)

⁵⁴ Für jeden Probanden an min. 2, max. 6 nicht aufeinanderfolgenden Tagen ermittelt (= 34 Bestimmungen).

⁵⁵ 19 Bestimmungen

⁵⁶ 15 Bestimmungen

Gegen einen generellen Einfluss der Derivatisierungstechnik auf die Fluoreszenz oder Detektierbarkeit bestimmter Vitamere, z.B. PLP, spricht die uneinheitliche Tendenz der Ergebnisse, so ermitteln auch Arbeiten mit weitgehend gleicher Derivatisierung (z.B. 2 und 6) unterschiedlich hohe Nüchternkonzentrationen.

5 Auch werden durch die Hypothese "mangelnde Fluoreszenz der derivatisierten Aldehydgruppe" nicht die ebenfalls niedrigeren Messwerte der nicht-derivatisierten Vitamere erklärt. Dies deutet vielmehr auf grossen Einfluss der unterschiedlichen Probanden hin. Häufig sind in den unter methodenbezogenen Gesichtspunkten ausgewählten Arbeiten der vorstehende Tabellen keine bzw.
10 nur unvollständige Angaben zum Versorgungsstatus der Probanden zu finden. Erhebliche Auswirkungen können hierbei nicht ausgeschlossen werden, z.B. durch eine Phase der Vitaminsupplementation vor dem Versuchstag oder die Dauer der Nahrungskarenz vor Blutentnahme. Idealerweise müssten verschiedene Untersuchungstechniken an gleichem Probenmaterial parallel angewendet
15 werden um endgültige Aussagen zum Vitamerspektrum zu erhalten, alternativ könnten auch Ringversuche mit verschiedenen Untersuchern erfolgen. Dies würde jedoch den Rahmen der vorliegenden Arbeit bei weitem übersteigen. Weiterhin grossen Einfluss hat die Art der Blutaufbereitung bzw. ihrer Dauer, so zeigte sich in den Vorversuchen zur vorliegenden Arbeit, dass auch bei gekühl-
20 ter Lagerung der entnommenen Blutproben bereits nach 10-15 Minuten durch Übertritt aus den Erythrozyten (Hämolyse oder Diffusion) der Vitamin B6-Gehalt, speziell PLP, sich nahezu verdoppelt hatte⁵⁷.

Neben den Plasma-Werten können auch die Nüchternwerte der Urinexkretion mit anderen Studien verglichen werden. Unter Hochrechnung auf 24 Stunden
25 mit den Werten aus Tabelle 8 (Seite 63) ergibt sich hier eine sehr gute Übereinstimmung mit in Beziehung auf Probandenauswahl, Supplementation, Wartephase u.a. vergleichbaren Arbeiten: Zemleni 1992: 10,8 - 16,5 µmol/24h (nur PA), Gregory et al. 1979: 3-42 µmol (nur PA); eigene Untersuchung 11,0 - 17,8 µmol <Vitamin B6+PA>, davon ca. 95% als PA. In der Literatur, so z.B. in
30 der VERA-Studie finden sich häufig etwas niedrigere Basiswerte (5 – 8 µmol)⁵⁸, dabei handelt es sich jedoch um nicht-supplementierte Probanden.

⁵⁷ vgl. auch den für die vorliegenden Untersuchungen aufgestellten Qualitätsparameter : Zeitraum von Blutentnahme bis Beginn der Aufbereitung ≤ 5 Minuten bei Kühlung und Dunkelheit.

⁵⁸ vgl. Ubbink 1987, Schultz 1987, Combs 1992 [29,128,151]

5.1.2. weitere Parameter

Beim Vergleich weiterer methodenbezogener Eckdaten (siehe nachfolgende Tabelle) ist die benutzte Analysentechnik den bisher veröffentlichten Arbeiten mindestens gleichwertig und häufig sogar überlegen. Beispielhaft ausgewählt werden die als Entwicklungsvorlage benutzte online-Methode von Kimura, deren ursprüngliche Vorgängermethode Edwards und die von Speitling 1991 benutzte Technik als typische auf biokinetische Fragestellungen spezialisierte Anwendung sowie die sehr umfassenden und ausführlich validierten Lebensmitteluntersuchungen von Ollilainen.

10 Tabelle 26: Gegenüberstellung einiger methodischer Parameter

Parameter	eigene	Kimura 1996 et al. [74]	Edwards 1989 et al. [38]	Speitling 1991 [131]	Ollilainen 2000 [107]
Bestimmungsgrenze PLP (Plasma)	0,25 pmol	0,5 pmol	ca. 2 pmol	n.a.	—
Wiederfindung PLP (Plasma)	104,4 %	96 %	92,5 %	94,9 %	—
Bestimmungsgrenze PN (Lebensmittel)	0,37 ± 0,05 pmol ⁵⁹	—	—	—	0,3–0,9 pmol
Wiederfindung PN (Lebensmittel)	98,8 ± 2,3 % ⁶⁰	—	—	—	95 ± 7 %
Bestimmungsgrenze PA (Urin)	0,33 pmol	—	—	n.a.	—
Wiederfindung PA (Urin)	96,6 %	—	—	103,6 %	—
bestimmbare B6-Formen (Plasma)	PLP PMP PN PL PM PA	PLP PL PN PA 2.Lauf: PMP PM	PNP PLP PMP PN PL PM PA	PLP PN PL PA	—
bestimmbare B6-Formen (Lebensmittel)	PLP PMP PN PL PM PA	—	—	—	PLP PMP PN PL PM PA
bestimmbare B6-Formen (Urin)	PLP PMP PN PL PM PA	—	—	PLP PN PL PA	—
PNG-Quantifizierung	Differenzbestimmung	nein	nein	nein	Differenzbestimmung
Analysendauer (ohne PNG)	33 min davon Elution: 18 min	13 min zzgl. Equilibrierung	25 min	32 min davon Elution: 19 min	37 min davon Elution: 22 min

Insbesondere im Vergleich zur bereits gegenüber Edwards 1989 verbesserten Methode Kimura 1996 ist ein deutlicher Fortschritt in Bezug auf Methodenparameter wie die Bestimmungsgrenze erkennbar, der auch nicht durch eine we-

⁵⁹ Mittelwert Karottensaft / Blumenkohlzubereitung

⁶⁰ Mittelwert Karottensaft / Blumenkohlzubereitung

sentlich verlängerte (Gesamt-)Analysendauer erkaufte wurde, da im Gegensatz zur Methode Kimura alle Vitamere in einem Analysenlauf⁶¹ bestimmt werden können. Die Qualitätsparameter entsprechen auch der von Ollilainen 1999 bzw. 2000 publizierten sehr guten Methode, welche allerdings nur für Lebensmittel anwendbar war.

5.1.3. Kritik des analytischen Verfahrens

5.1.3.1. Prinzipielle Überlegungen

Die grundsätzlichen Vorteile einer isokratischen HPLC-Methode (z.B. Reproduzierbarkeit, technischer Aufwand) gegenüber einer Gradientensteuerung werden häufig durch die höhere Selektivität von Gradienten aufgewogen. Weitere Kriterien bei der Methodenauswahl sind die bessere Elution der organischen Matrix durch unpolare Lösungsmittel, aber schlechtere Peaktrennung sowie die Möglichkeit der Beeinflussung der Fließgeschwindigkeit und damit unmittelbar der Analysendauer. Das entwickelte Steuerprogramm versucht, die o.g. Vorteile beider Techniken zu nutzen: Isokratische Elution der relevanten Peaks mit sehr polarem Lösungsmittel, danach ein relativ unpolarer Gradient um sonstige Bestandteile der Probenmatrix von der Säule zu waschen. Gute Peaktrennung durch niedrige Fließgeschwindigkeit während der Elution der B6-Formen, kürzere Analysenzeit durch höhere Fließgeschwindigkeit in unkritischen Zeitabschnitten.

Die eingesetzte online-Derivatisierung stellt einen Kompromiss dar zwischen unkomplizierter Handhabung und möglichst idealen (Reaktions-)Bedingungen zur Detektion der B6-Formen, speziell der PLP-Derivatisierung (Reaktion mit der 4'-Aldehydgruppe des PLP). Die Messwerte legen den Schluss nahe, dass eine hinreichende Derivatisierung erfolgt ist, vgl. dazu die Chromatogramme in Abbildung 9 und Abbildung 10 auf Seite 132 (gleiche Probe in Fließmittel mit/ohne Bisulfit-Zusatz).

Der hohe Aufwand der Differenzbestimmung der gebundenen B6-Formen vor und nach einer Enzyminkubation stellt zunächst einen Nachteil dar. Andererseits liegt hier im Gegensatz zur direkten Bestimmung im Chromatogramm (anhand von Standard-Substanzen) auch das Potenzial zur Erfassung bislang unidentifizierter Glucoside ohne Rücksicht auf Zuckerrest (Glucose, Mannose⁶²) oder Bin-

⁶¹ Unberücksichtigt bleibt bei diesem direkten Vergleich der Analysenzeiten die Enzyminkubation, da Edwards bzw. Kimura keine gebundenen B6-Formen bestimmten.

⁶² Glc und Man können mit der Mehrzahl der zur Zeit eingesetzten Verfahren zur Glucosid-Quantifizierung (einschl. MS) nicht voneinander unterschieden werden.

dungspunkt (4' vs. 5'). Die Notwendigkeit der Erfassung von α - zusätzlich zu den β -Glucosiden ist bislang noch unzureichend aufgeklärt, wäre aber durch Einsatz entsprechender Enzyme (z.B. EC 3.2.1.20) ohne weitere Modifikation⁶³ der vorgestellten Methode möglich. Potenzielle Nebenaktivitäten der eingesetzten Enzyme, zumindest soweit die Inhaltsstoffe der Proben betroffen sind, die in den Chromatogrammen erfasst werden, konnten durch die Blindbestimmungen (Bidest statt Enzym zugesetzt) als quantitativ unbedeutend eingestuft werden.

Grundsätzliche methodische Alternativen zur vorgestellten HPLC-Technik wären der verstärkte Einsatz massenspektrometrischer Verfahren und die Anwendung von stabilen Isotopen. Hierbei ist von der Massenspektrometrie (MS) prinzipbedingt weniger ein Beitrag zur routinemässigen Quantifizierung als vielmehr zur Strukturaufklärung bislang noch unbekannter Derivate zu erwarten. Im Falle der vorliegenden Untersuchungen könnten somit die bislang nicht identifizierten Peaks⁶⁴ (nicht-Vitamin B6) weiter analysiert werden. Die Präzision der mengenmässigen Bestimmung der Vitamin B6-Gehalte der hier untersuchten Proben mit der angewandeten Methodik könnte durch MS-Techniken mit vergleichbarem finanziellem und personellem Aufwand allerdings nicht erreicht werden.

Eine verbesserte Möglichkeit der B6-Quantifizierung innerhalb von Stoffwechselstudien bieten Lebensmittel mit intrinsischer Markierung, vgl. hierzu die Arbeiten von Gregory et al. – hierbei stehen jedoch Fragestellungen im Mittelpunkt, die sich deutlich vom in dieser Arbeit untersuchten Ansatz unterscheiden. In der Arbeitsgruppe Gregory untersuchte man beispielsweise (Nakano 1997) die Bioverfügbarkeit von PNG vs. PN, jeweils ²H-markiert und als Salze in verschiedenen Verhältnissen appliziert. Als Messgrösse diente dabei die Urinexkretion von des Metaboliten [²H]-PA. Hierbei wurden zwar semiquantitative Aussagen zur vermuteten Absorptionshemmung von PN durch PNG gewonnen, allerdings konnten die Ergebnisse dieser Untersuchung nicht auf verzehrsübliche Lebensmittel übertragen werden.

⁶³ Ausnahme: pH-Wert zur Enzyminkubation auf 6,8 statt 5,0 einstellen

⁶⁴ vgl. Abschnitt 3.2.1.2.3

5.1.3.2. Potenzielle Verbesserungen

Bei einer Reihe von Punkten können, ohne Berücksichtigung der praktischen Durchführbarkeit, weitere Verbesserungen der eingeführten analytischen Methode diskutiert werden.

- 5 • Ungelöst bleibt die zusätzliche Validierung der Routinemessungen durch Zugabe einer Standardsubstanz wie dPN, welches bislang wegen der schlechten Detektierbarkeit und wegen seiner späten Elution nicht eingesetzt werden kann.
- 10 • Durch polychromatische (Fluoreszenz-)Detektion wäre eine noch bessere Vitamer-Erfassung bzw. der jeweiligen Fluoreszenzmaxima möglich; aber Realisierung schwierig, da mindestens drei Wellenlängen erforderlich wären → Aufwand grösser als zu erwartende Vorteile, da die verwendeten Wellenlängen bereits unter besonderer Gewichtung der schwieriger zu detektierenden Vitamere ausgewählt wurden.
- 15 • Detektion der einzelner B6-Formen
 - 20 o **Pyridoxalphosphat** (PLP): Relativ frühe Elution (→ hinreichende Abtrennung von Einspritzpeak erforderlich), aber relativ gute Fluoreszenz mit scharfem Peakverlauf. Wenig Gefahr der Überlagerung mit anderen Peaks bei sauren Messbedingungen, jedoch Detektion nicht zuverlässig möglich in inkubierter Probe (pH 5) durch Unterlagerung und Vielzahl ablaufender Nebenreaktionen während des Inkubierens⁶⁵.
 - 25 o **Pyridoxaminphosphat** (PMP): kleinerer, dem PLP ähnlicher Peak, der wenig später eluiert wird.
 - 30 o **Pyridoxin** (PN): Weit von anderen Peaks abgesetzt, kaum Überlagerungen. Aber bei sehr niedrigen Konzentrationen eher ungünstige Peakform → Bestimmungsgrenzen für physiologischen Bereich noch gerade ausreichend; durch Inkubieren der Proben (E, I) erfolgt – unter Ausserachtlassung des PNG-Umsatzes – praktisch keine Beeinflussung von Peakgrösse und Form.
 - o **Pyridoxal** (PL): von allen in der Bestimmung berücksichtigten Vitameren der unsymmetrischste Peakverlauf ("Buckelform"); grosse Gefahr der Überlagerung mit Matrixpeaks (vgl. die von Kimura

⁶⁵ Die ursprünglich angestrebte PLP-Messung bei pH 5 wurde zugunsten der exakteren Bestimmung im stärker sauren Bereich verworfen.

1996 beschriebenen Probleme). → Begrenzter Wertebereich, innerhalb dessen PL zuverlässig detektiert werden kann.

Es ist in der vorliegenden Arbeit gelungen, die Methodenparameter so exakt zu einzustellen, dass die ermittelten physiologischen Konzentrationen von PM und PN in den Bereich optimaler oder nahezu optimaler Erfassung fielen. Die vorsorglich entwickelten zusätzlichen Aufbereitungsschritte (vgl. Abschnitt 3.2.4.4) für den Fall abweichender Konzentrationen kamen somit nicht zur Anwendung. Alternativ denkbar wäre die PL-Detektion mit anderen Methodenparametern (z.B. pH-Wert, Fluoreszenz-Wellenlängen, Fließmittelzusammensetzung), wodurch jedoch die hohe Qualität der Quantifizierung anderer B6-Formen beeinträchtigt würde.

- o **Pyridoxamin** (PM): Form ähnlich PN, quantitativ eher unbedeutend, Elution 1-2 Minuten vor PN; einziges Problem: Möglichkeit der Elutionsumkehr PM-PN am Ende der Säulen-Lebensdauer.
- o **4'-Pyridoxinsäure** (PA): PA besitzt sehr starke Fluoreszenz mit steilen Peakverläufen und wird spät eluiert, daher sehr gut detektierbar und hohe Empfindlichkeit auch für geringfügige Konzentrationsänderungen. Bei Enzym-Inkubation einer Probe erfolgt häufig eine Grössenzunahme, jedoch nicht bei Inkubation von reinem Standard. Da in der Literatur bislang keine PA-Glucoside berichtet werden, wird eine exogene Quelle für diese Zunahme (z.B. Oxidation von Vitameren aus der Probe vom Alkohol PN zur Carbonsäure PA) vermutet. Solange die Ursache dieser Zunahme nicht einwandfrei geklärt werden kann, könnte hier eine nicht unbedeutende Fehlerquelle liegen. Andererseits konnte mit dem gewählten methodischen Vorgehen (Proben-Aufteilung in E, I und R⁶⁶) gewährleistet werden, dass die in die weiteren Auswertungen einbezogenen Zahlenwerte präzise und richtig waren, insbesondere die Werte für Vitamin B6 sind nicht tangiert; ausserdem lag die beobachtete Zunahme für totales <Vitamin B6+PA> nahezu ausschliesslich in der Grössenordnung von 1-2% und war damit quantitativ eher unbedeutend.
- o gebundene Vitamere (**Glucoside**, PNG): Eine Identifikation eines oder mehrerer spezifischer PNG-Peaks in den Proben war nicht

⁶⁶ zur Erläuterung der Kürzel siehe Tabelle 1 auf Seite 24.

möglich, es wurden zwar, wie auch z.B. von Ollilainen 2000 in ähnlicher Form berichtet, bei der Enzyminkubation mindestens drei nicht zugeordnete Peaks kleiner, diese Abnahme war jedoch nicht proportional zur Zunahme des freien PN-Peaks. Dies spricht
5 entweder für mangelnde Fluoreszenz von PNG in biologischer Matrix bzw. starke Überlagerung durch andere Substanzen oder für die Möglichkeit, dass durch die Enzymaktivität während des Inkubierens eine Reihe von glykosidischen Bindungen gespalten werden, die nicht notwendigerweise auf PN beschränkt sein müssen.

10 o Lactone (z.B. 4'-Pyridoxolacton) und andere Bindungen (Schiffsche Basen etc.) sind für die Chromatogramme nur von sehr geringer Bedeutung bzw. mit Fluoreszenz-Detektion nicht zuverlässig zu erfassen. Häufig handelt es sich um Artefakte (Probenaufbereitung), die durch geringe Stabilität im sauren Medium (Gregory
15 1997 [53]) und sehr niedrige Konzentrationen schwierig zu quantifizieren sind.

- Die Verwendung von Vollblut anstelle von Plasma wurde zu einem frühen Stadium der kinetischen Versuche erwogen, um anfänglich bestehende Probleme durch Hämolyse bei der Blutentnahme zu umgehen. Vollblut
20 erwies sich aber in den Vorversuchen als ungeeignete Matrix für die beabsichtigten biokinetischen Untersuchungen im physiologischen Bereich.
- Die versuchsweise Umkehr der Aufbereitungsschritte pH-Einstellung und Eiweiss-Fällung brachte keine Verbesserung der Analysenergebnisse. Es wurden tendenziell weniger Vitamere gefunden, vermutlich durch die
25 längere Bearbeitungszeit vor Fällung (Stabilisierung) der Probe. Deproteinierung erst nach der Enzyminkubation führte zu unbrauchbaren Proben, da offensichtlich während der Inkubation Reaktionen der Proteinbestandteile der Probe abliefen. Zweimalige TCA-Fällung (vor/nach Inkubation) unterschied sich im Chromatogramm nicht von der eingeführten
30 Aufbereitung, die Einbringung von Protein durch die Glucosidase-Zugabe scheint demnach vernachlässigbar gering.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1. Lebensmittel

Tabelle 27: Vergleich einiger Messwerte für Lebensmittel

nmol/100g	Ollilainen 2000 [1079]		Eigene Messung		
	Karotten	Broccoli	Karotten- saft [nmol/100ml]	Broccoli- Zubereitung	Blumenkohl- Zubereitung
PLP	36	130	22-47	$\Sigma =$ 103-158	84-92
PMP	8	60	0-35		10-28
PL	54	105	12-71		31-40
PM	3	10	0-58		70-92
PN (frei)	n.d.	124	310-518	410-562	208-428
PA	24	578	79-102	72-402	47-294
Vitamin B6 (frei)	101	429	356-729	513-720	411-672
PNG	76,7 Gew% ⁶⁷	39,9 Gew%	174-770	124-382	260-506
Vitamin B6 (total) berechnet als PN	n.a. (96 µg)	n.a. (150 µg)	682-1.499 (115-253 µg)	844-895 (142-151 µg)	917-932 (155-158 µg)

5

Die bei ähnlichem Vitamerspektrum und vergleichbarem Gesamtgehalt festgestellten Abweichungen der Messwerte sind weniger durch Unterschiede der analytischen Methodik, sondern vielmehr durch Unterschiede in den Probenmatrices (verarbeitet vs. frisch) zu erklären sowie durch den Vitamingehalt der Ausgangsware: Ollilainen (Finnland) selbst beschreibt beispielsweise den Vitamin B6-Gehalt von Karotten in verschiedenen Ländern (Tabellenwerte) und stellt für seine Untersuchungen nochmals niedrigere Messwerte dar (berechnet als µg PN): Ollilainen: 96, Finnland (Rastal et al. 1993): 120, Deutschland (Souci et al. 1994) 270. Insofern liegen die in dieser Arbeit ermittelten Werte (vgl. Tabelle 7) genau im zu erwartenden Wertebereich. Dabei bleibt der Vergleich

15

⁶⁷ keine absoluten Werte angegeben.

mit anderen Angaben aus der Literatur für die Blumenkohlzubereitung wenig aussagekräftig, da die Untersuchung von Rohware bzw. die Beurteilung von Zubereitungsverlusten nicht Gegenstand dieser Arbeit war. Für die gewählten Untersuchungen war es ausschliesslich bedeutsam, die von den Probanden tatsächlich verzehrte Mengen an Vitamin B6 zu bestimmen.

Die gemessenen, im Vergleich zu den anderen Säften höheren Glucosidwerte für Karottensaft 1 (siehe Tabelle 6) können neben anderem Ausgangsmaterial auch mit unterschiedlichen Verarbeitungsverfahren erklärt werden, z.B. der Wirkung von Enzymen mit glykolytischer (Neben-)Aktivität bei der industriellen Herstellung von Saft 2 und 3. Saft 1 wurde für die kinetischen Versuche nicht wegen seiner Deklaration "aus ökologischen Anbau" oder wegen seines Herstellungsverfahrens ausgewählt, sondern wegen des Gehaltes an gebundenen B6-Formen, der zwischen den in den Testreihen 1 und 2 eingesetzten Gemüsezubereitungen lag und somit bei für die Probanden zumutbarer Verzehrsmenge eine quantitativ bedeutende Zufuhr an Glucosiden erlaubte.

5.2.2. Biokinetische Versuche

Beim Vergleich mit einigen methodisch ähnlichen Arbeiten⁶⁸, die andere Dosierungen gewählt haben (Wozenski, Maschner, Thakker, Speitling; siehe Abschnitt 2.3), zeigt sich eine starke Korrelation von applizierter Dosis [mg freies PN-HCl] zu resultierender Höchstkonzentration ($c_{\max}$, nüchternwertbereinigt) [nmol/l Plasma-Vitamin B6] bzw. AUC (Fläche unter der Kurve, nüchternwertbereinigt) [h·nmol/l Plasma-Vitamin B6], siehe folgendes Diagramm. Dabei sind die höheren Werte von Speitling rechnerisch berücksichtigt, aber nicht eingezeichnet; aus der Arbeit von Wozenski konnte nur $c_{\max}$ übernommen werden. Alle Daten wurden in gleiche Dimensionen umgerechnet.

⁶⁸ Versuchsdurchführung (orale Applikation) ähnlich und Datenaufbereitung kompatibel

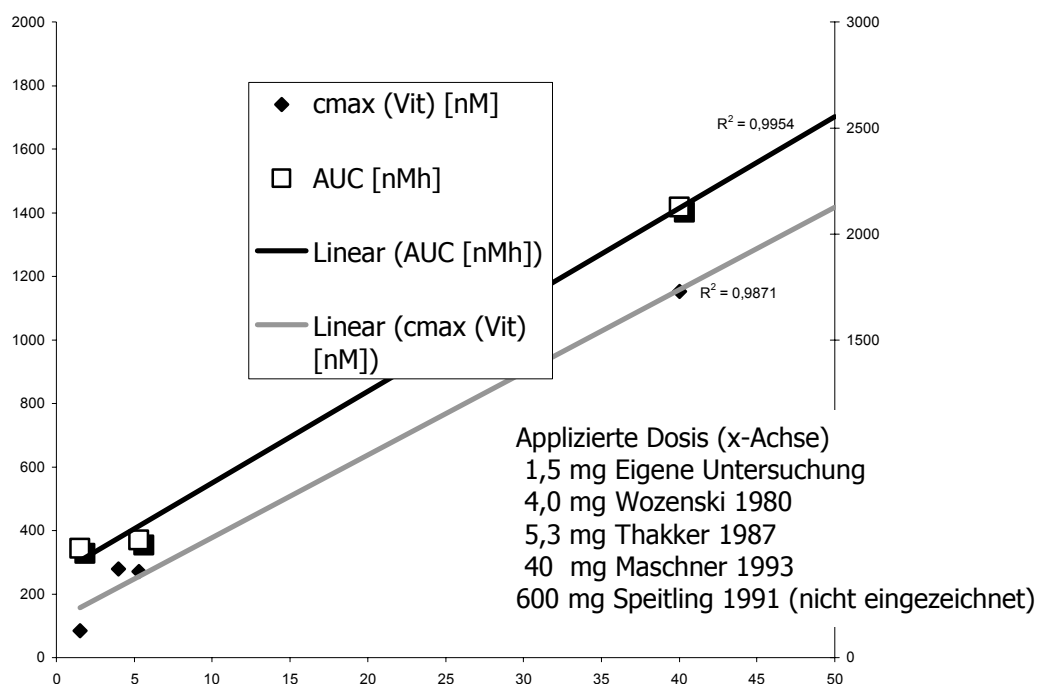


Diagramm 35: Relation von applizierter Dosis PN-HCl [mg] (x-Achse) und resultierender Plasma-Netto-C_{max} [nmol/l] (linke y-Achse) bzw. AUC [nMh] (rechte y-Achse).

- 5 Insgesamt ergibt sich bei der Betrachtung der ermittelten kinetischen Werte für freies Vitamin B6 ein ähnliches Bild in der vorliegenden Arbeit wie es umfassender von Speitling 1991⁶⁹ für höhere Dosen beschrieben wurde, auch wird abhängig von der Menge der Zufuhr PA ausgeschieden. Auffallend ist auch bei Versuchsperson 02 beim Vergleich der Daten aus den Testreihen 3 und 4 (Rein-
- 10 substanz p.o., proportional bzw. konstant dosiert), dass bei der höheren Dosierung im kinetischen Modell⁷⁰ keine Invasionsphase errechnet wird; dieses Phänomen wird (für wesentlich höhere Dosen) auch von Speitling berichtet, ohne dass dafür bislang eine befriedigenden Erklärung bekannt ist. Mit i.v.-Applikation von ebenfalls hohen Dosen (67fache Menge) (Zempleni und Kübler 1994 [163]) wurde eine stärkere Bildung anderer Vitamere aus PN festge-
- 15 stellt als nach oraler Gabe, dies wurde in der vorliegenden Arbeit (Testreihe 6 vs. 4) mit der verabreichten niedrigen Dosis nicht beobachtet.

⁶⁹ In einer hochdosierten kinetischen Studie (Speitling 1991 [131], 400fache Dosis) wurde eine einphasige PN-Elimination aus dem Plasma ermittelt, andere B6-Formen wurden zweiphasig eliminiert mit einer Adaptation an die zugeführte Menge. Die kinetischen Größen der Urinsekretion wurden nicht durch die Zufuhrmengen beeinflusst und PA bildet die Hauptausscheidungsform für das zugeführte PN.

⁷⁰ siehe Diagramm 27

- Bislang liegen nur wenige und zum Teil widersprüchliche Aussagen vor zur Bioverfügbarkeit von gebundenem Vitamin B₆, in Bezug auf kinetische in-vivo Humanstudien mit physiologischer Darreichung und Dosierung. Es gibt oder gab eine Reihe von Arbeitsgruppen (u.a. Deutschland: Bitsch-R/Schramm, Finnland: Bognar/Ollilainen, Spanien: Sierra/Vidal-Valverde) die in den letzten 10 Jahren Untersuchungen zum Gehalt an gebundenem Vitamin B₆ von Lebensmitteln publiziert haben, Kinetische Versuche am Menschen mit diesen Vitaminquellen werden jedoch schwerpunktmässig nur von der Arbeitsgruppe Gregory (USA) publiziert.
- Speziell bei Betrachtung der Netto-Exkretion zeigt Blumenkohl im Vergleich zur Reinsubstanz (T₄) tendenziell (T₃, marktfrischer BK) bzw. signifikant (T₂, Tiefkühl-BK) geringere relative Bioverfügbarkeit. Hierfür können im wesentlichen zwei Faktoren verantwortlich gemacht werden. Zum einen die geringe Bioverfügbarkeit des PNG im Vergleich zu PN, welche in der Literatur im Mittel verschiedener Lebensmittel mit 58% angegeben wurde (Gregory et al. 1991 [59]) und in dieser Arbeit für den marktfrischen Blumenkohl mit 46,3%⁷¹ ermittelt wurde. Ein zweiter Faktor ist die Hemmung der PN-Absorption durch den hohen Anteil von PNG (Gilbert 1992, Nakano 1995 [49,99ff.]). Diese Beeinflussung des freien PN würde die niedrigere rechnerische Bioverfügbarkeit (20,1%) des PNG im Tiefkühlgemüse erklären.⁷² Da die Testmahlzeiten (T₂, T₃ und T₅) in Bezug auf wesentliche die Absorption beeinflussende Parameter wie Konsistenz, Vitamingehalt, Portionsvolumen sehr ähnlich zusammengesetzt waren, kann von einem dominierenden Einfluss des variierten Parameters "PNG-Gehalt" ausgegangen werden, wenngleich andere Faktoren nicht völlig ausgeschlossen werden können. Insbesondere gestützt wird die Annahme dadurch, dass beim Vergleich der Lebensmittel-Testreihen (T₁, T₂ und T₅, jedoch nicht T₄-Reinsubstanz) bei ähnlichem PNG-Gehalt auch nahezu gleiche relative Bioverfügbarkeit errechnet wurde. Eine weitere ernährungsphysiologische Bewertung der unterschiedlichen Blumenkohl-Mahlzeiten (T₁/T₂) in Bezug auf ihren Beitrag zur Vitamin B₆-Versorgung ist aus den vorliegenden Werten ($n=3$) noch nicht zuverlässig möglich ($p>5\%$), wenngleich sich bei Vergleich der Plasmakurven und der Nettoexkretionen eine tendenziell bessere Eignung der marktfrischen

⁷¹ Karottensaft: 42,1%

⁷² Für diese rein rechnerische Betrachtung wird – bezogen auf die durchgeführten Testreihen – die BV von freiem PN als konstant eingesetzt, unabhängig von der Vitaminquelle. Wenn aber die tatsächliche BV von freiem PN durch die PNG-Konzentration herabgesetzt wird (rechnerische BV von PN höher als tatsächliche), ergibt sich mathematisch folgend (Gesamtabsorption gleich) eine in gleichem Masse im Vergleich zur tatsächlichen BV niedrigere rechnerische BV von PNG.

Ware abzeichnet. Offensichtlich ist in der Tiefkühlware nicht nur weniger freies Vitamin B6 vorhanden, sondern darüber hinaus scheint auch noch dessen Resorption durch die Anwesenheit von PNG gehemmt zu sein.

Die höhere Plasma-AUC nach Lebensmittelverzehr im Vergleich zur Reinsubstanz-Testreihe deuten auf einen unterschiedlichen Response auf unterschiedlich zusammengesetzte Vitaminquellen (nur PN in T4 vs. Vitamergemisch im Lebensmittel) hin. Wozenski et al. 1980 und auch Nguyen et al. 1983 [104,159] berichteten entsprechende Phänomene, d.h. einen deutlich verringerten und verzögerten Anstieg der Plasmaspiegel nach oraler Gabe von PM im Vergleich zu PN. Insofern könnte eine deutlich unterschiedliche Absorptionsrate oder Absorptionsgeschwindigkeit der einzelnen Vitamere beim Menschen von Bedeutung sein. Eine weitere Rolle für die höhere Plasma-AUC spielt sicherlich die verzögerte Absorption aus Lebensmitteln, was durch die signifikant grössere⁷³ $t_{\max}$ belegt werden kann (siehe Tabelle 20).

Die unterschiedlichen Werte für Bioverfügbarkeit bei Betrachtung von Plasma-AUC und Nettoexkretion für die p.o.-Reinsubstanz lassen sich aus den reinen Messergebnissen bzw. aus der Literatur (mangels Vergleichsmöglichkeit mit zuverlässigen Quellen) nicht erklären, wenngleich ähnliche Phänomene auch von anderen Autoren berichtet wurden (vgl. Gregory 1997 [53]). Eine plausible Arbeitshypothese lautet: PN aus der oralen Gabe von Reinsubstanz taucht im Plasma nicht vollständig in detektierbarer Form (d.h. Vitamer oder Metabolit PA) auf, sondern wird komplex gebunden transportiert und liegt erst im Urin wieder detektierbar (überwiegend als PA) vor. Für PL und PLP wird beispielsweise die Bildung von Pyridoxyllysin berichtet, welches lt. Gregory nicht mit HPLC-Verfahren detektiert werden kann (Gregory et al. 1980b, 1987 und 1997 [51,53,57]), aber wieder etwa zur Hälfte freie Vitamere bilden kann. Eine weitere Arbeitshypothese wäre ein so schneller Plasmatransport des freien PN bzw. eine so schnelle renale Ausscheidung, dass die Plasmaspiegel nicht signifikant erhöht würden. Eher gegen diese Vermutung spricht die Tatsache, dass die höchste Stunden-Ausscheidung bei den Versuchspersonen nach etwa 3 Stunden beobachtet wurde. Die verabreichte Reinsubstanz (PN-HCl) enthielt keine pharmazeutischen Hilfsstoffe⁷⁴, die eine so stark verzögerte Absorption erklären könnten. Hier setzen vielmehr weitere Überlegungen an, die im Zusammenhang mit der Absorption von PNG bzw. freiem Vitamin B6 noch weiterer Prüfung bedürfen, nämlich die Depotfunktionen der Leber oder anderer Organe.

⁷³ 29,3 %, $p < 0,01$

⁷⁴ Zusätzlich zur HPLC-Bestimmung erfolgte eine Überprüfung durch MS-Analyse.

Der gewählte nicht-invasive Ansatz mit einer Versuchsdauer von etwa 8 Stunden könnte zur vollständigen Erfassung dieser Fragestellung auf 24 Stunden ausgedehnt werden (vgl. Speitling 1991, Zemleni et al. 1992 u.a. [131,161ff.]). Dabei wird aber dann mit Blick auf das Wohlbefinden der Probanden das Problem einer vitamin-B6-freien Ernährung aufgeworfen, die zudem die Absorption der Testmahlzeiten nicht beeinflussen darf. Ein kompletter Nüch-
tertag, wie er im Rahmen der Vorversuche mehrfach durchgeführt wurde, steht hingegen im Widerspruch zum Versuchsansatz, möglichst physiologische Stoffwechselsituationen abzubilden. Aber in einem weiteren Schritt kann anhand der bislang gewonnenen exakten Daten zum freien Vitamin B6 untersucht werden, inwieweit neben der bereits bekannten Depotfunktion der Leber weitere Organe, z.B. die Darmmucosa die Funktion eines Sekundärdepots übernehmen. Beides sind jedoch Aufgabenstellungen, die weit das für die vorliegende Arbeit notwendige Mass der praktischen Erprobung einer entwickelten und modifizierten HPLC-Methodik übersteigen.

Im Rahmen der Vorversuche zur Methodenentwicklung wurde unabhängig⁷⁵ von der vorliegenden Arbeit eine Pilotstudie mit der Bestimmung von Urin- und Plasmakurven einiger ausgewählter B6-Formen (PN, PA) nach Verabreichung von Getränken (Mineralwasser, Fruchtsaft⁷⁶, Energydrink⁷⁷) in einer 6 mg PN-HCl enthaltenden Menge im Vergleich zu intravenöser Gabe und einem Nüch-
tertag (Versuchsdauer jeweils 6-10 Stunden, ein Proband) durchgeführt. Auch hierbei ergab sich ein inkonklusives Bild beim Vergleich der relativen Bioverfügbarkeiten anhand von Plasma- und Exkretionsdaten⁷⁸. Da diese Untersuchung nicht auf die vollständige Erfassung des Vitamerspektrums (bzw. der stoffwechselaktiven B6-Formen) ausgerichtet war und wegen unterschiedlicher analytischer bzw. rechnerischer Verfahren sind die Ergebnisse⁷⁹ aber nur in der Tendenz mit den Werten aus dieser Arbeit vergleichbar.

Eine auch quantitative Beantwortung der Frage, ob eventuell Plasma-Transporte aus der oralen Reinsubstanz nicht vollständig erfasst werden (im Gegensatz zu i.v.-Reinsubstanz und Lebensmittelverzehr) wäre durch den ergänzenden Einsatz von ¹³C-markiertem Pyridoxin möglich, vgl. Exkurs 5.2.3.

⁷⁵ Diplomarbeit Petra Häussler, IfE Giessen 1999.

⁷⁶ Multi12 (Multivitaminsaft), Muti12 GmbH Berghülen

⁷⁷ Megadyn von Tetesept GmbH

⁷⁸ relative BV (Plasma-AUC von PLP, Nettowerte) 122% (Energy-Drink) und 127% (Fruchtsaft), relative BV (8h-Nettoexkretion von PA) 85% (Energy-Drink) und 119% (Fruchtsaft).

⁷⁹ Poster Petra (Jena) anführen

Insgesamt haben sich die durchgeführten kinetischen Versuche mit *gebundener* Vitamin B6 trotz der niedrigen applizierten Dosis als sehr sinnvolles Vorgehen erwiesen. Jedoch bedürfen die Berechnungen auf Basis der Exkretion von PA und Vitameren weiterer quantitativer Untersuchungen und kinetischer Messrechnungen, die mit dem augenblicklichen Stand der analytischen Technik bzw. der einsetzbaren Software nicht zu leisten sind. Einerseits muss die applizierte Vitamindosis im physiologischen Bereich liegen, kann also nicht wesentlich erhöht werden. Andererseits stossen die im Urin gefundenen Konzentrationen (speziell PNG) an die Grenzen der Messgenauigkeit der HPLC-Technik, so dass die Anwendung der Kompartiment-Modelle hier keine aussagekräftigen zusätzlichen Ergebnisse liefern konnte und daher nur die Nettoexkretion ausgewertet wurde. Speziell die Absorption von PNG *in-vivo* kann zwar qualitativ, aber nicht immer auch exakt quantitativ gezeigt werden. Gute und auch quantitativ aussagekräftige Ergebnisse ergeben sich hingegen bei der Betrachtung der Plasmakurven (empirische Werte) und der kinetischen Modelle, die durch gut angepasste Kurven und überzeugende Kenngrößen die gewählte analytische Technik als sehr gut geeignet für Bioverfügbarkeitsstudien erscheinen lassen. Insofern wurden die Aussagen von Gregory von 1997 [53] bestätigt: "*Short-term (~8 h) bioassays with human subjects can provide information regarding [...] absorption of vitamin B-6 from a single dose [...] to determine relative bioavailability. This method is best suited for evaluation of vitamin supplements or single meals [...] A confounding factor is the differential response obtained between administered pyridoxine, PL and PM.*"⁸⁰

⁸⁰ JF Gregory; Bioavailability of vitamin B-6, Eur J Clin Nutr (1997) 51 Suppl.; p. S46 (r).

5.2.3. Exkurs: Ergänzende Untersuchungen zur PNG-Absorption

Die primäre Aufgabenstellung in der vorliegenden Arbeit war die Ausarbeitung und Überprüfung der Anwendbarkeit einer HPLC-Methode zur Bestimmung von Vitamin B6 im Rahmen von Bioverfügbarkeitsstudien. Eine umfassende lebensmittelchemische Analytik oder gar Strukturaufklärung von nicht selbst vitaminwirksamen Vorstufen bzw. Komplexen war nicht beabsichtigt.

Für die Beurteilung der Bioverfügbarkeit ist es vielmehr vordringlich, möglichst präzise die Frage zu beantworten, wie viel an vitaminaktiver Substanz in der systemischen Zirkulation auftaucht bzw. welche vitaminaktive Substanz oder welche eindeutig dem Vitaminstoffwechsel zuzuordnenden Metaboliten (hier: PA) ausgeschieden werden. Hier wäre es von Vorteil, die klassischen HPLC-Techniken, wie sie auch in dieser Arbeit eingesetzt wurden, mit Methoden zu kombinieren, die es erlauben, den Stoffwechsel einzelner Moleküle zu untersuchen.

Hierzu würde sich die Markierung mit stabilen Isotopen anbieten, um z. B. den Metabolismus von PNG zu untersuchen. In einem „in-vivo“-Versuch könnte geklärt werden, ob PNG intakt absorbiert wird oder ob nach der Absorption eine Reglykosylierung erfolgt. Voraussetzung wäre ein PNG-Molekül, in dessen Ringstrukturen selektiv einzelne Atome gegen stabile Isotope ausgetauscht würden. Besonders geeignet ist die Kombination von ^{15}N und ^{13}C , da diese Nuklide in einem Analysengang mittels IR-MS⁸¹ quantifiziert werden könnten. Abbildung 8 zeigt eine vereinfachte Strukturformel des PNG mit den vorgeschlagenen stabilen Isotopen ^{15}N im Pyridin-Ring und ^{13}C im Zuckerrest.

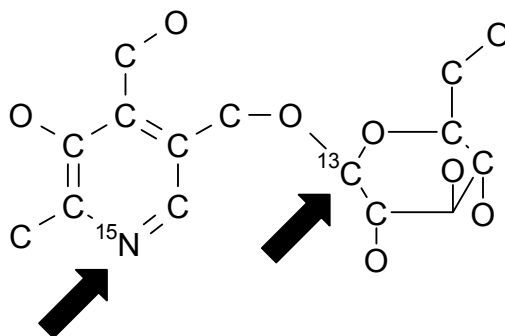


Abbildung 8: Mit stabilen Isotopen markiertes PNG

Eine Testmahlzeit mit so markiertem PNG und zusätzlich verfügbarer freier Glucose (nur ^{12}C , deutlich höher dosiert als PNG) könnte ohne ethische Probleme Probanden verabreicht werden. Anschliessend könnte das Verhältnis von $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ bzw. $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ in peripherem Blut bzw. in Portalblut bestimmt werden. Somit wäre eine Aussage zum Stoffwechsel vor und nach Passage der Leber möglich. Von den Messwerten der IR-MS soll hier nur das Verhältnis von ^{15}N zu ^{13}C betrachtet werden.

⁸¹ Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie

- Sofern PNG intakt absorbiert wird, ergibt sich im Blut das Verhältnis $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$, das auch in der Testmahlzeit gemessen wurde. Dies ist unabhängig von der absoluten Höhe der PNG-Absorption, da für jedes absorbierte ^{15}N -Atom auch genau ein ^{13}C -Atom in das Blut gelangt. Eine postabsorptive Spaltung von PNG ändert die genannten $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Verhältnisse nicht.
- Falls es im Darm vor der Absorption zu einer Spaltung des PNG in PN und Glc kommt, wird das $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Verhältnis nach Absorption signifikant höher als in der Testmahlzeit ausfallen. Die PN-Aufnahme durch passive Diffusion ist quantitativ nicht limitiert, während der aktive Glc-Transport einer Sättigungskinetik unterliegt und sich dadurch mengenmässig deutlich abhebt. Ein weiterer Effekt tritt durch die in der Testmahlzeit im Überschuss vorhandene ^{12}C -Glc auf, wodurch letztlich sehr viel mehr ^{15}N als ^{13}C -Moleküle absorbiert werden.
- Auch eine Reglykosylierung nach Absorption würde das $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Verhältnis nicht verändern, da in der Mucosazelle deutlich mehr ^{12}C -Glc als ^{13}C -Glc zur Verfügung stünde.

Durch Vergleich der Absorptionsraten von ^{15}N -PN und ^{13}C -Glc wären auch annähernd quantitative Aussagen über Mischformen der Absorption möglich.

- Der skizzierte Versuchsaufbau stellt eine mögliche Ergänzung zu den bisher durchgeführten Untersuchungen dar. Damit könnte man einen guten Einblick in die noch weitgehend unbekannten Mechanismen der PNG-Absorption bekommen. Der Vorteil dabei wäre, dass solche Studien auch "in-vivo", also am Menschen durchgeführt werden können.

5.3. Fazit

- Die vorgestellte HPLC-Methode hat sich als sehr gut geeignetes Instrument zur vitamerspezifischen Bestimmung von Vitamin B6 in Plasma, Urin und Lebensmitteln erwiesen. Ihre besondere Eignung für den routinemässigen Einsatz
- 5 konnte in der praktischen Anwendung gezeigt werden. Die Kenngrössen zur Methodenqualität entsprechen oder übertreffen bisher bekannte, auf eine oder wenige Matrices spezialisierten Methoden. Ausserdem sind durch Minimierung oder Standardisierung systemischer Fehler die Messergebnisse sehr viel besser
- 10 direkt übertragbar. Nicht nur die Quantifizierung durch die eigentliche HPLC-Technik, sondern auch die Probenvorbereitung in den drei Matrices konnte ohne Qualitätseinbussen vereinheitlicht und damit besser als bisher vergleichbar gemacht werden. Die zusätzlich integrierte verbesserte Enzyminkubation zur Bestimmung von gebundenem Vitamin B6 entspricht den aktuellsten publizierten Methoden (z.B. Ollilainen 2000 [107]).
- 15 Der zur Anwendung der analytischen Verfahren gewählte biokinetische Versuchsansatz hat sich grundsätzlich als sehr geeignet erwiesen. Mit der Anwendung auf gebundenes Vitamin B6 bei gleicher Gesamtdosierung, aber deutlich niedrigerer Bioverfügbarkeit wurden die Grenzen der Anwendbarkeit dieses Verfahrens abgesteckt. Insgesamt jedoch konnten, obwohl die gewählten physiologischen
- 20 Dosierungen im Verhältnis zu bisherigen vergleichbaren Studien mit natürlichen Vitaminquellen überaus niedrig waren, aussagefähige Daten für freies Vitamin B6 gewonnen werden. Somit steht ein funktionelles analytisches Verfahren für eine Vielzahl weiterer kinetischer Auswertungen zur Verfügung.

6. Zusammenfassung

- Zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit von Vitamin B6 ist eine exakte Quantifizierung von sehr niedrigen Konzentrationen der Vitamere in verschiedenen Matrices (z.B. Lebensmittel, Plasma, Urin) erforderlich. Bislang standen zwar einzelne gute HPLC-Methoden für bestimmte Untersuchungsmaterialien Verfügung. Aufgrund der unterschiedlichen Spezifitäten, z.B. erfasstes Vitamerspektrum, ist jedoch ein Vergleich der so gewonnen Daten schwierig und mit nicht abschätzbaren Fehlern behaftet. Bei vielen HPLC-Techniken ist ausserdem häufig eine sehr aufwändige Nachsäulenderivatisierung erforderlich.
- In der vorliegenden Arbeit wurden ausgehend von einer modernen matrixspezifischen Methodik mit online-Derivatisierung die analytischen Verfahren soweit modifiziert und verbessert, dass sehr gute Qualitätsparameter (z.B. Wiederfindungsrate, Präzision, Analysendauer) in verschiedenen Matrices erreicht wurden. Durch die entwickelte Methode war es möglich, die bisherigen Nachteile beim Vergleich von Messwerten aus verschiedenen Matrices zu beseitigen. Durch Vereinheitlichung der Probenaufbereitung konnten quantitative Daten, z.B. aus dem Plasma und einer Testmahlzeit, direkt miteinander verglichen werden, ohne dass langwierige Berechnungen zu den Auswirkungen unterschiedlicher Abläufe zum Probenaufschluss oder zur Deproteinierung erforderlich waren. Gleichzeitig konnte durch die verbesserte Probenaufbereitung und die optimierte Detektion die zur Vitamin B6-Quantifizierung notwendige Blutentnahmemenge drastisch gesenkt werden.
- Die ausgearbeitete RP-HPLC-Technik mit Fluoreszenz-Detektion und online-Derivatisierung ermöglicht es, in einem Analysengang alle fünf bedeutenden Vitamere des Vitamin B6 sowie den Metaboliten Pyridoxinsäure zu quantifizieren. Die besondere Eignung dieser Methode zeigte sich bei den physiologischen Konzentrationen, welche wesentlich unterhalb des Bereiches lagen, der von bisherigen Versuchen, universell einsetzbare HPLC-Methode zu etablieren, berücksichtigt wurde.
- In einen weiteren Schritt wurde die Analytik ergänzt, um neben den überwiegenden freien Formen auch gebundenes Pyridoxin, speziell Pyridoxin- β -Glucosid, quantifizieren zu können. Hierbei zeigte sich eine indirekte Bestimmung durch enzymatische Freisetzung des gebundenen Pyridoxins als sehr geeignetes Verfahren, da somit wesentlich mehr Glucoside erfasst werden konnten, als es mit einer direkten Messung anhand eines spezifischen Standards möglich gewesen wäre.

Die neue Methode wurde mit Zustimmung der Ethik-Kommission des Klinikums der JLU in insgesamt 6 Testreihen mit bis zu 12 freiwilligen, gesunden Probanden einer praktischen Prüfung unterzogen.

- 5 • In den Testreihen 1 und 2 wurden als Testmahlzeiten Blumenkohlportionen mit einem Vitamin B6-Gehalt in physiologischer Grössenordnung verzehrt. Die jeweilige Menge war in beiden Testreihen jeweils gleich und an das Körpergewicht der 3 Probanden angepasst. In Testreihe 1 wurde Tiefkühl-Blumenkohl mit hohem Gehalt an Pyridoxin-Glucosid eingesetzt, während in Testreihe 2 marktfrischer Blumenkohl mit deutlichen niedrigerem Glucosid-Anteil verwendet wurde. Abgesehen von den Testmahlzeiten blieben die Probanden in allen Testreihen während der Versuchstage mindestens 8 Stunden nüchtern. Die Körperspeicher waren im Vorfeld durch Supplementation bis zum vorletzten Tag aufgefüllt worden. Die Bestimmung von Vitamin B6 (Vitamere und Metabolit) erfolgte im 10 Stundenurin sowie in Plasmaproben. Die Auswertung erfolgte anhand von nüchternwertbereinigten Plasmakonzentrationen und der Fläche unter der Plasmakurve bei Anwendung eines biokinetischen Zweikompartiment-Modelles sowie der Netto-Exkretion.
- 20 • In den Testreihe 3 und 4 wurden Bezugswerte zur relativen Bioverfügbarkeit mit Pyridoxin-Reinsubstanz als p.o.-Applikation gesammelt. Die Durchführung erfolgte als Testreihe mit den drei Probanden aus den ersten beiden Testreihen und einer dem Körpergewicht proportionalen Dosierung (1,2-2,0 mg) sowie als Testreihe 4 mit 12 Probanden und einer einheitlichen Dosierung von 1,5 mg in Anlehnung an die nicht- 25 körpergewichtsabhängigen Zufuhrempfehlungen.
- In Testreihe 5 verzehrten die 12 Probanden aus Testreihe 4 Karottensaft mit Mark, bei dem der Anteil der Glucoside am Vitamin B6-Gehalt von 1,5 mg zwischen den Werten aus den Testreihen 1 und 2 lag, während die Gesamtmenge an Vitamin B6 Testreihe 4 entsprach.
- 30 • In der abschliessenden Testreihe 6 (n=1) wurde ergänzend die absoluten Bioverfügbarkeit aus einer i.v.-Applikation von Pyridoxin-Reinsalz in einer den Referenzwerten der DGE entsprechenden Menge von 1,5 mg bestimmt.

Die Ergebnisse belegen die Leistungsfähigkeit der bereitgestellten analytischen Verfahrens. Insbesondere die universelle Anwendbarkeit und die sehr zuverlässige Erfassung eines vollständigen Vitamer-Spektrums auch bei niedrigen Konzentrationen, die sich in den Vorversuchen herausgestellt hatte, konnte auch im
5 routinemässigen Einsatz voll bestätigt werden.

Mit ausgewählten biokinetischen Auswertungen konnte eine gute Basis für weiterführende Untersuchungen gelegt werden. Dabei wurde ein proportionaler Zusammenhang zwischen dem Anteil an PN-Glucosiden (PNG) und der Bioverfügbarkeit sowohl anhand der Plasmakurven als auch den Nettoexkretion ge-
10 zeigt⁸². D.h. beim Vergleich der Auswertungen der Testmahlzeiten sinkt mit steigendem PNG-Gehalt die Bioverfügbarkeit sowohl des gesamten enthaltenen Vitamin B6, z.B. von 69,4% bei marktfischem Blumenkohl (T2) auf 46,2% bei glucosidreicherem Tiefkühl-Blumenkohl (T1, 55 statt 28%)⁸³; aber auch die Bioverfügbarkeit des freien Pyridoxins alleine wird beeinträchtigt.

15 Neben den Werten zur Bioverfügbarkeit betreffen weitere Ergebnisse zur Biokinetik die Absorption von Pyridoxin. Hierbei stellt sich, wie bereits vereinzelt in der Literatur berichtet, eine nicht vollständig lineare Aufnahme vom Darmlumen bis mindestens zum Portalblut dar.

20

⁸² vgl. Tabelle 22 f. auf Seite 93 f.

⁸³ vgl. Tabelle 24 auf Seite 94.

6.1. Literatur

- 1 Allman, M. A., Pang, E., Yau, D. F., Stewart, P. M., Tiller, D. J., & Truswell, A. S. (1992)
Elevated plasma vitamers of vitamin B6 in patients with chronic renal failure on regular haemodialysis.
Eur.J.Clin.Nutr. 46: 679-683.
- 2 Amin, M. & Reusch, J. (1987)
High-performance liquid chromatography of water-soluble vitamins. Part 3. Simultaneous determination of vitamins B1, B2, B6, B12 and C, nicotinamide and folic acid in capsule preparations by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography.
Analyst 112: 989-991.
- 3 Ang, C. Y. W., Cenciarelli, M., & Eitenmiller, R. R. (1988)
A simple liquid chromatographic method for determination of B6 vitamers in raw and cooked chicken.
Journal of Food Science 53: 371-375.
- 4 Argekar, A. P. & Sawant, J. G. (1999)
Simultaneous determination of pyridoxine hydrochloride and doxylamine succinate from tablets by ion pair reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC).
Drug Development and Industrial Pharmacy 25: 945-950.
- 5 Argoudelis, C. J. (1988)
Simple isocratic high-performance liquid chromatographic method for the separation of the six vitamers of vitamin B6.
J.Chromatogr. 424: 315-323.
- 6 Argoudelis, C. J. (1990)
Simple isocratic high-performance liquid chromatographic method for measuring pyridoxine kinase activity in crude biological extracts.
J.Chromatogr. 526: 25-33.
- 7 Argoudelis, C. J. (1997)
Simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of all seven vitamin B6-related compounds.
J.Chromatogr.A 790: 83-91.
- 8 Bailey, A. L., Wright, A. J. A., & Southon, S. (1999)
High performance liquid chromatography method for the determination of pyridoxal-5-phosphate in human plasma: How appropriate are cut-off values for vitamin B-6 deficiency?
European Journal of Clinical Nutrition 53: 448-455.
- 9 Banks, M. A. & Gregory, J. F., III (1994)
Mice, hamsters and guinea pigs differ in efficiency of pyridoxine-5'-beta-D-glucoside utilization.
J.Nutr. 124: 406-414.
- 10 Bates, C. J. & Heseker, H. (1994)
Human Bioavailability of vitamins.
Nutrition Research Reviews 7: 93-127.
- 11 Benedikt, J., Roth-Maier, D. A., & Kirchgessner, M. (1996)
[The effect of different vitamin B6 supplies on the vitamin B6 status (pyridoxine,

- pyridoxal and pyridoxamine) of the liver and the body of lactating rats].
Z.Ernahrungswiss. 35: 273-281.
- 12 Bhagavan, H. (1985)
Interaction between Vitamin B-6 and drugs; 401-15;
5 Alan R. Liss, Inc. Vitamin B-6: Its Role in health and Disease.
- 13 Bishop, R. E. & Tryfiates, G. P. (1989)
Biosynthesis of a novel form of vitamin B-6 by tumor cells.
J.Nutr. 119: 189-195.
- 14 Bitsch, R. & Moller, J. (1989)
10 Analysis of B6 vitamers in foods using a modified high-performance liquid chromatographic method.
J.Chromatogr. 463: 207-211.
- 15 Bognar, A. (1985)
[Determination of vitamin B6 in food using high pressure liquid chromatography].
15 Z.Lebensm.Unters.Forsch. 181: 200-205.
- 16 Bognar, A. & Ollilainen, V. (1997)
Influence of extraction on the determination of vitamin B6 in food by HPLC.
Z.Lebensm.Unters.Forsch. 204: 327-335.
- 17 Bowman, B. B. & McCormick, D. B. (1989)
20 Pyridoxine uptake by rat renal proximal tubular cells.
J.Nutr. 119: 745-749.
- 18 Bötticher, B. & Bötticher D. (1987)
A new HPLC-method for the simultaneous determination of B1-, B2-, and B6-
vitamers in serum and whole blood.
25 Int.J.Vitam.Nutr.Res. 57: 273-278.
- 19 Brown, M. R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C., & Trenerry, C. (1999)
The vitamin content of microalgae used in aquaculture.
Journal of Applied Phycology 11: 247-255.
- 20 Canella, T. & Bichi, G. (1983)
30 Determinazione contemporanea mediante HPLC di tiamina, riboflavina, piridossine, cianocobalamina, nicotinamide e calcio folinato in preparazioni multivitaminiche.
Boll.Chim.Farm. 122: 205-209.
- 21 Chang, S. J. (2000)
35 Vitamin B-6 antagonists alter the function and ultrastructure of mice endothelial cells.
Journal of Nutritional Science and Vitaminology 46: 149-153.
- 22 Cheng, S. & Trumbo, P. R. (1993)
40 Pyridoxine-5'-beta-D-glucoside: metabolic utilization in rats during pregnancy and availability to the fetus.
J.Nutr. 123: 1875-1879.
- 23 Chhabra, A. & Dudhe, A. (1999)
Simultaneous determination of ruminal niacin, pyridoxine, thiamin and riboflavin levels by high performance liquid chromatography.
45 Indian Journal of Animal Sciences 69: 567-569.
- 24 Chrisley, B. M., McNair, H. M., & Driskell, J. A. (1991)
Separation and quantification of the B6 vitamers in plasma and 4- pyridoxic acid

- in urine of adolescent girls by reversed-phase high- performance liquid chromatography.
J.Chromatogr. 563: 369-378.
- 5 25 Chung, S. H., Caidan, S. J., & Norris, D. K. (1985)
Enhancement of brain pyridoxal 5'-phosphate level following chronic ingestion of ethanol.
Neuroscience Letters 62: 219-224.
- 10 26 Coburn, S. P. & Mahuren, J. D. (1983)
A versatile cation-exchange procedure of measuring the seven major forms of vitamin B6 in biological samples.
Anal.Biochem. 129: 310-317.
- 15 27 Coburn, S. P., Mahuren, J. D., & Guilarte, T. R. (1984)
Vitamin B-6 content of plasma of domestic animals determined by HPLC, enzymatic and radiometric microbiological methods.
J.Nutr. 114: 2269-2273.
- 20 28 Coburn, S. P., Mahuren, J. D., Kennedy, M. S., Schaltenbrand, W. E., Sampson, D. A., O'Connor, D. K., Snyder, D. L., & Wostmann, B. S. (1988)
B6 vitamers content of rat tissues measured by isotope tracer and chromatographic methods.
Biofactors 1: 307-312.
- 25 29 Cook, N. E. & Carpenter, K. J. (1988)
Ethanol and leucine as possible stress factors in rats marginally deficient in niacin and vitamin B-6.
J.Nutr. 118: 963-967.
- 30 30 Crozier, P. G., Cordain, L., & Sampson, D. A. (1994)
Exercise-induced changes in plasma vitamin B-6 concentrations do not vary with exercise intensity.
Am.J.Clin.Nutr. 60: 552-558.
- 35 31 Czeizel, A. E. & Merhala, Z. (1998)
Bread fortification with folic acid, vitamin B12, and vitamin B6 in Hungary.
Lancet 352: 1225.
- 40 32 Daniel, H. (1982)
In vitro Kinetik des intestinalen Transportes von Pyridoxin und Riboflavin - Vergleich mit dem Transport von D-Glucose, Diss. U Giessen.
- 45 33 Dinc, E., Baleanu, D., & Onur, F. (2001)
Chemometric quantitative analysis of pyridoxine HCl and thiamine HCl in a vitamin combination by principal component analysis, classical least squares, and inverse least squares techniques.
Spectroscopy Letters 34: 279-288.
- 34 34 Dinc, E., Kokdil, G., & Onur, F. (2000)
A comparison of matrix resolution method, ratio spectra derivative spectrophotometry and HPLC method for the determination of thiamine HCl and pyridoxine HCl in pharmaceutical preparation.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 22: 915-923.
- 35 35 Driskell, J. A. (1994)
Vitamin B-6 requirements of humans.
Nutrition Research 14: 293-324.

- 36 Driskell, J. A. & Chrisley, B. M. (1987)
High-performance liquid chromatographic analysis of vitamin B-6 components in
tissues and status assessment.
Nutrition Reports International 35: 1247-1259.
- 5 37 Driskell, J. A., Chrisley, B. M., Reynolds, L. K., & Moak, S. W. (1991)
Plasma B6 vitamer and plasma and urinary 4-pyridoxic acid concentrations of
middle-aged obese black women.
J.Chromatogr. 568: 333-340.
- 10 38 Edwards, P., Liu, P. K., & Rose, G. A. (1989)
A simple liquid-chromatographic method for measuring vitamin B6 compounds in
plasma.
Clin.Chem. 35: 241-245.
- 15 39 Edwards, P., Liu, P. K., & Rose, G. A. (1990)
Liquid chromatographic studies of vitamin B6 metabolism in man.
Clin.Chim.Acta 190: 67-80.
- 40 Eitenmiller, R. R. (1998)
Vitamin Analysis for the Health and Food Science; 382-91
CRC Press LLC, Boca Raton FL, USA. 0-849-2668-0
- 20 41 Ekanayake, A. & Nelson, P. E. (1986)
An in vitro method for estimating biologically available vitamin B6 in processed
foods.
Br.J.Nutr. 55: 235-244.
- 25 42 Esteve, M. J., Farre, R., Frigola, A., & Garcia-Cantabella, J. M. (1998)
Determination of vitamin B-6 (pyridoxamine, pyridoxal and pyridoxine) in pork
meat and pork meat products by liquid chromatography.
Journal of Chromatography A 795: 383-387.
- 30 43 Esteve, M. J., Farre, R., Frigola, A., & Garcia-Cantabella, J. M. (2001)
Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in mushrooms by liquid
chromatography.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 1450-1454.
- 44 European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. (2000)
Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level
of Vitamin B6
Scientific Health opinions (19 October 2000);
- 35 45 Friedrich, W. (1987)
Vitamin B6. In: Handbuch der Vitamine pp. 349-397.
Urban & Schwarzenberg, München.
- 40 46 Furth-Walker, D., Leibman, D., & Smolen, A. (1990)
Relationship between blood, liver and brain pyridoxal phosphate and pyridoxam-
ine phosphate concentrations in mice.
J.Nutr. 120: 1338-1343.
- 47 Gauch, R., Leuenberger, U., & Muller, U. (1992)
[Determination of water-soluble vitamins B1, B2, B6 and B12 in milk using HPLC].
Z.Lebensm.Unters.Forsch. 195: 312-315.
- 45 48 Gerster, H. (1996)
[The importance of vitamin B 6 for development of the infant. Human medical
and animal experiment studies].
Z.Ernahrungswiss. 35: 309-317.

- 49 Gilbert, J. A. & Gregory, J. F., III (1992)
Pyridoxine-5'-beta-D-glucoside affects the metabolic utilization of pyridoxine in rats.
J.Nutr. 122: 1029-1035.
- 5 50 Gladtko, E., von Hattingberg, HM. (1973)
Pharmakokinetik
Berlin, Springer-Verlag. 3-540-06061-8
- 10 51 Gregory, J. F., III (1980)
Comparison of high-performance liquid chromatographic and *Saccharomyces uvarum* methods for the determination of vitamin B6 in fortified breakfast cereals.
J.Agric.Food Chem. 28: 486-489.
- 52 Gregory, J. F., III (1989)
Bioavailability of vitamin B-6 from plant foods.
Am.J.Clin.Nutr. 49: 717.
- 15 53 Gregory, J. F., III (1997)
Bioavailability of vitamin B-6.
Eur.J.Clin.Nutr. 51 Suppl 1: S43-S48.
- 20 54 Gregory, J. F., III (1998)
Nutritional Properties and significance of vitamin glycosides.
Annu.Rev.Nutr. 18: 277-296.
- 55 Gregory, J. F., III & Feldstein, D. (1985)
Determination of vitamin B-6 in foods and other biological materials by paired-ion High performance liquid chromatography.
J.Agric.Food Chem. 33: 359-363.
- 25 56 Gregory, J. F., III & Ink, S. L. (1987)
Identification and quantification of pyridoxine-beta-glucoside as a major form of vitamin B-6 in plant-derived foods.
J.Agric.Food Chem. 35: 76-82.
- 30 57 Gregory, J. F., III & Litherland, S. A. (1986)
Efficacy of the rat bioassay for the determination of biologically available vitamin B-6.
J.Nutr. 116: 87-97.
- 35 58 Gregory, J. F., III & Sartain, D. B. (1991)
Improved chromatographic determination of free and glycosylated forms of vitamin B-6 in foods.
J.Agric.Food Chem. 39: 899-905.
- 40 59 Gregory, J. F., III, Trumbo, P. R., Bailey, L. B., Toth, J. P., Baumgartner, T. G., & Cerda, J. J. (1991)
Bioavailability of pyridoxine-5'-beta-D-glucoside determined in humans by stable-isotopic methods.
J.Nutr. 121: 177-186.
- 45 60 Hakanson, R. (1964)
Separation and Identification of Pyridoxal and Pyridoxal-5-Phosphat by paper Chromatography;
J.Chromatogr. 263-5;
- 61 Hamaker, B., Kirksey, A., Ekanayake, A., & Borschel, M. (1985)
Analysis of B-6 vitamers in human milk by reverse-phase liquid chromatography.
Am.J.Clin.Nutr. 42: 650-655.

- 62 Hansen, C. M., Leklem, J. E., & Miller, L. T. (1996)
Vitamin B-6 status indicators decrease in women consuming a diet high in pyridoxine glucoside.
J.Nutr. 126: 2512-2518.
- 5 63 Hefferan, T. E., Chrisley, B. M., & Driskell, J. A. (1986)
Quantitation of B6 vitamers in rat plasma by high-performance liquid chromatography.
J.Chromatogr. 374: 155-161.
- 10 64 Heiskanen, K., Kallio, M., Salmenpera, L., Siimes, M. A., Ruokonen, I., & Perheentupa, J. (1995)
Vitamin B-6 status during childhood: tracking from 2 months to 11 years of age.
J.Nutr. 125: 2985-2992.
- 15 65 Hess, D. & Vuilleumier, J. P. (1989)
Assay of pyridoxal-5'-phosphate, pyridoxal and pyridoxic acid in biological material.
Int.J.Vitam.Nutr.Res. 59: 338-343.
- 20 66 Hiraoka, M. (2001)
Nutritional status of vitamin A, E, C, B1, B2, B6, nicotinic acid, B12, folate, and beta-carotene in young women.
J.Nutr.Sci.Vitaminol.(Tokyo) 47: 20-27.
- 67 Hirose, N., Kubo, N., & Tsuge, H. (1990)
Highly sensitive determination of PLP in human plasma with HPLC method.
J.Nutr.Sci.Vitaminol.(Tokyo) 36: 521-529.
- 25 68 Hollins, B. & Henderson, J. M. (1986)
Analysis of B6 vitamers in plasma by reversed-phase column liquid chromatography.
J.Chromatogr. 380: 67-75.
- 30 69 Huff, J. W. & Perlzweig, W. A. (1944)
A Product of oxidative Metabolism of Pyridoxine, 2-Methyl-3-Hydroxy-4-Carboxy-5-Hydroxy-Methylpyridine (4-Pyridoxic Acid).
J.Biol.Chem. 155: 345-355.
- 35 70 Joseph, T. & McCormick, D. B. (1995)
Uptake and metabolism of riboflavin-5'-alpha-D-glucoside by rat and isolated liver cells.
J.Nutr. 125: 2194-2198.
- 71 Joseph, T., Tsuge, H., Suzuki, Y., & McCormick, D. B. (1996)
Pyridoxine 4'-alpha- and 5'-alpha-D-glucosides are taken up and metabolized by isolated rat liver cells.
J.Nutr. 126: 2899-2903.
- 40 72 Kabir, H., Leklem, J. E., & Miller, L. T. (1983)
Comparative vitamin B-6 bioavailability from tuna, whole wheat bread and peanut butter in humans.
J.Nutr. 113: 2412-2420.
- 45 73 Kang-Yoon, S. A., Kirksey, A., Giacoia, G. P., & West, K. D. (1995)
Vitamin B-6 adequacy in neonatal nutrition: associations with preterm delivery, type of feeding, and vitamin B-6 supplementation.
Am.J.Clin.Nutr. 62: 932-942.

- 74 Kimura, M., Kanehira, K., & Yokoi, K. (1996)
Highly sensitive and simple liquid chromatographic determination in plasma of B6
vitamers, especially pyridoxal 5'-phosphate.
J.Chromatogr.A 722: 296-301.
- 5 75 Kurioka, S., Ishioka, N., Sato, J., Nakamura, J., Ohkubo, T., & Matsuda, M.
(1993)
Assay of vitamin B6 in human plasma with graphitic carbon column.
Biomed.Chromatogr. 7: 162-165.
- 10 76 Leclerc, J. (1977)
[Thiamine, riboflavin and vitamin B6 contents of organs in the aged rat. I. Effect
of vitamin supplementation administered in drinking water].
Ann.Nutr.Aliment. 31: 19-25.
- 15 77 Leclerc, J. (1978)
[Tissue thiamine, riboflavin and vitamin B6 in the aged rat. II. Effects of vitamin
supplementation in the diet on the excretion of vitamins and its tissue levels].
Ann.Nutr.Aliment. 32: 753-763.
- 20 78 Leibman, D., Furth-Walker, D., Smolen, T. N., & Smolen, A. (1990)
Pyridoxal 5'-phosphate and pyridoxamine 5'-phosphate concentrations in blood
and tissues of mice fed ethanol-containing liquid diets.
Alcohol 7: 61-68.
- 79 Leklem, J. E. (1990)
Vitamin B-6: a status report.
J.Nutr. 120 Suppl 11: 1503-1507.
- 25 80 Leklem, J. E. (1997)
Vitamin B6. In: Modern Nutrition in Health and Disease (Shils, M. E., Olson, J. A.,
& Shike, M., eds.), pp. 383-394.
Lea & Febiger, New York.
- 81 Leonard, S. W. & Leklem, J. E. (2000)
Plasma B-6 vitamer changes following a 50-km ultramarathon.
30 International Journal of Sport Nutrition 10: 302-314.
- 82 Löwik, M. R. H., Schrijver, J., van den Berg, H., Hulshof, K. F., Wedel, M., & Ock-
huizen, T. (1990)
Effect of dietary fiber on the vitamin B-6 status among vegetarian and nonvege-
tarian elderly (Dutch Nutrition Surveillance System).
35 Journal of the American College of Nutrition 9: 241-249.
- 83 Lui, A., Lumeng, L., & Li, T. K. (1985)
The measurement of plasma vitamin B6 compounds: comparison of a cation- ex-
change HPLC method with the open-column chromatographic method and the L-
tyrosine apodecarboxylase assay.
40 Am.J.Clin.Nutr. 41: 1236-1243.
- 84 Lumeng, L. (1978)
The role of acetaldehyde in mediating the deleterious effect of ethanol on pyri-
doxal 5'-phosphate metabolism.
J.Clin.Invest 62: 286-293.
- 45 85 Lumeng, L., Cleary, R. E., & Li, T. K. (1974)
Effect of oral contraceptives on the plasma concentration of pyridoxal phosphate.
Am.J.Clin.Nutr. 27: 326-333.

- 86 Lumeng, L. & Li, T. K. (1974)
Vitamin B6 metabolism in chronic alcohol abuse. Pyridoxal phosphate levels in plasma and the effects of acetaldehyde on pyridoxal phosphate synthesis and degradation in human erythrocytes.
J.Clin.Invest 53: 693-704.
- 87 Maeno, M., Morimoto, Y., Hayakawa, T., Suzuki, Y., & Tsuge, H. (1997)
Feeding experiments of pyridoxine derivatives as vitamin B-6.
International Journal for Vitamin and Nutrition Research 67: 444-449.
- 88 Mahuren, J. D. & Coburn, S. P. (1990)
B6 vitamers; cation exchange HPLC.
J.Nutr.Biochem. 1: 659-663.
- 89 Martinez, M., Cuskelly, G. J., Williamson, J., Toth, J. P., & Gregory, J. F., III (2000)
Vitamin B-6 deficiency in rats reduces hepatic serine hydroxymethyltransferase and cystathionine beta-synthase activities and rates of in vivo protein turnover, homocysteine remethylation and transsulfuration.
J.Nutr. 130: 1115-1123.
- 90 Mascher, H. (1993)
Determination of total pyridoxal in human plasma following oral administration of vitamin B6 by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization.
J.Pharm.Sci. 82: 972-974.
- 91 Masse, P., Vuilleumier, J. P., & Weiser, H. (1989)
Pyridoxine status as assessed by the concentration of B6-aldehyde vitamers.
Int.J.Vitam.Nutr.Res. 59: 344-352.
- 92 Matte, J. J., Ponter, A. A., & Seve, B. (1997)
Effects of chronic parenteral pyridoxine and acute enteric tryptophan on pyridoxine status, glycemia and insulinemia stimulated by enteric glucose in weanling piglets.
Canadian Journal of Animal Science 77: 663-668.
- 93 McChrisley, B., Thye, F. W., McNair, H. M., & Driskell, J. A. (1988)
Plasma B6 vitamer and 4-pyridoxic acid concentrations of men fed controlled diets.
J.Chromatogr. 428: 35-42.
- 94 McMahon, L. G., Nakano, H., Levy, M. D., & Gregory, J. F., III (1997)
Cytosolic pyridoxine-beta-D-glucoside hydrolase from porcine jejunal mucosa. Purification, properties, and comparison with broad specificity beta-glucosidase.
J.Biol.Chem. 272: 32025-32033.
- 95 Millart, H. & Lamiable, D. (1989)
Determination of pyridoxal 5'-phosphate in human serum by reversed phase high performance liquid chromatography combined with spectrofluorimetric detection of 4-pyridoxic acid 5'-phosphate as a derivative.
Analyst 114: 1225-1228.
- 96 Moreno, P. & Salvado, V. (2000)
Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography.
J.Chromatogr.A 870: 207-215.

- 97 Morrison, L. A. & Driskell, J. A. (1985)
Quantities of B6 vitamers in human milk by high-performance liquid chromatography. Influence of maternal vitamin B6 status.
J.Chromatogr. 337: 249-258.
- 5 98 Möller, J. (1990)
Beitrag zur Analytik des Vitamin B6 mit Hilfe der Hochleistungs-
Flüssigkeitschromatography (HPLC), Diss U Giessen
Wissenschaftlicher Fachverlag, Gießen.
- 10 99 Nakano, H. & Gregory, J. F., III (1995)
Pyridoxine-5'-beta-D-glucoside influences the short-term metabolic utilization of
pyridoxine in rats.
J.Nutr. 125: 926-932.
- 15 100 Nakano, H. & Gregory, J. F., III (1995)
Pyridoxine and pyridoxine-5'-beta-D-glucoside exert different effects on tissue B-6
vitamers but similar effects on beta-glucosidase activity in rats.
J.Nutr. 125: 2751-2762.
- 20 101 Nakano, H., McMahon, L. G., & Gregory, J. F., III (1997)
Pyridoxine-5'-beta--glucoside exhibits incomplete bioavailability as a source of vitamin B-6 and partially inhibits the utilization of co- ingested pyridoxine in humans.
J.Nutr. 127: 1508-1513.
- 25 102 Ndaw, S., Bergaentzle, M., Aoudé-Werner, D., & Hasselmann, C. (2000)
Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B6 in foodstuffs.
Food Chemistry 71: 129-138.
- 30 103 Nelson, E. W., Jr., Lane, H., & Cerda, J. J. (1976)
Comparative human intestinal bioavailability of vitamin B-6 from a synthetic and a natural source.
J.Nutr. 106: 1433-1437.
- 35 104 Nguyen, L. B. & Gregory, J. F., III (1983)
Effects of food composition on the bioavailability of vitamin B-6 in the rat.
J.Nutr. 113: 1550-1560.
- 40 105 O'Reilly, W. J., Guelen, P. J., Hoes, M. J., & van der, K. E. (1980)
High-performance liquid chromatographic determination of pyridoxine and congeners in biological fluids of man after high-dose therapy.
J.Chromatogr. 183: 492-498.
- 45 106 Olds, S. J., Vanderslice, J. T., & Brochetti, D. (1993)
Vitamin B-6 in raw and fried chicken by HPLC.
Journal of Food Science 58: 505-561.
- 107 Ollilainen, V. (1999)
HPLC analysis of vitamin B-6 in foods.
Agricultural and Food Science in Finland 8: 519-NIL.
- 108 Pierotti, J. A., Dickinson, A. G., Palmer, J. K., & Driskell, J. A. (1984)
Liquid chromatographic separation and quantitation of B6 vitamers in selected rat tissues.
J.Chromatogr. 306: 377-382.
- 109 Ramos-Martos, N., Aguirre-Gomez, F., Molinz-Diaz, A., & Capitan-Vallvey, L. F. (2001)

- Application of liquid chromatography to the simultaneous determination of acetylsalicylic acid, caffeine, codeine, paracetamol, pyridoxine, and thiamine in pharmaceutical preparations.
Journal of Aoac International 84: 676-683.
- 5 110 Reynolds, R. D. (1988)
Bioavailability of vitamin B-6 from plant foods.
Am.J.Clin.Nutr. 48: 863-867.
- 10 111 Rokitzki, L., Berg, A., & Keul, J. (1989)
[Serum and whole blood concentrations of fat and water soluble vitamins in normal persons and athletes].
Z.Gesamte Hyg. 35: 16-21.
- 15 112 Rokitzki, L., Sagredos, A. N., Reuss, F., Buchner, M., & Keul, J. (1994)
Acute changes in vitamin B6 status in endurance athletes before and after a marathon.
Int.J.Sport Nutr. 4: 154-165.
- 20 113 Sampson, D. A. & O'Connor, D. K. (1989)
Analysis of B-6 vitamers and pyridoxic acid in plasma, tissues and urine using high performance liquid chromatography.
Nutrition Research 9: 259-272.
- 25 114 Sampson, D. A. & O'Connor, D. K. (1989)
Response of B-6 vitamers in plasma, erythrocytes and tissues to vitamin B-6 depletion and repletion in the rat.
J.Nutr. 119: 1940-1948.
- 115 115 Sauberlich, H. E. (1984)
Newer laboratory methods for assessing nutriture of selected B-complex vitamins.
Annu.Rev.Nutr. 4: 377-407.
- 116 116 Sauberlich, H. E. (1985)
Bioavailability of vitamins.
Prog.Food Nutr.Sci. 9: 1-33.
- 30 117 Schramm, W., Bitsch, R. (199)
Distribution of Pyridoxine in plant Foods as affected by storing and processing;
Proc Euro Food Chem VI ; 885-90;
- 118 118 Schramm, W., Bitsch, R. (1992)
Free and bound Vitmain B6-Derivatives in plant food; 285-90;
- 35 119 Schramm, W., Bitsch, R. (1993)
Selective Measurement of Vitamin B-6-Derivatives in Plant Food; 417-21;
Bioavailability '93 B.o.Abs.
- 40 120 Schuster, K., Bailey, L. B., Cerda, J. J., & Gregory, J. F., III (1984)
Urinary 4-pyridoxic acid excretion in 24-hour versus random urine samples as a measurement of vitamin B6 status in humans.
Am.J.Clin.Nutr. 39: 466-470.
- 45 121 Seear, M., Lockitch, G., Jacobson, B., Quigley, G., & MacNab, A. (1992)
Thiamine, riboflavin, and pyridoxine deficiencies in a population of critically ill children.
J.Pediatr. 121: 533-538.
- 122 122 Shah, V. P., Midha, K. K., Dighe, S., McGilveray, I. J., Skelly, J. P., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C. T., Cook, C. E., McDowall, R. D., & . (1991)

- Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report.
Eur.J.Drug Metab Pharmacokinet. 16: 249-255.
- 5 123 Sharma, S. K. & Dakshinamurti, K. (1992)
Determination of vitamin B6 vitamers and pyridoxic acid in biological samples.
J.Chromatogr. 578: 45-51.
- 10 124 She, Q. B., Nagao, I., Hayakawa, T., & Tsuge, H. (1994)
A simple HPLC method for the determination of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in rat tissues: the effect of vitamin B6 deficiency on these concentrations in rat liver.
Biochem.Biophys.Res.Communic. 205: 1748-1754.
- 125 Shephard, G. S. & Labadarios, D. (1986)
Degradation of vitamin B6 standard solutions.
Clin.Chim.Acta 160: 307-311.
- 15 126 Shephard, G. S., Louw, M. E., & Labadarios, D. (1987)
Analysis of vitamin B6 vitamers in plasma by cation-exchange high- performance liquid chromatography.
J.Chromatogr. 416: 138-143.
- 20 127 Shephard, G. S., Van der, W. L., & Labadarios, D. (1989)
Analysis of vitamin B6 vitamers in human tissue by cation-exchange high- performance liquid chromatography.
J.Chromatogr. 491: 226-234.
- 25 128 Shultz, T. D. & Leklem, J. E. (1987)
Vitamin B-6 status and bioavailability in vegetarian women.
Am.J.Clin.Nutr. 46: 647-651.
- 129 Sierra, I. & Vidal-Valverde, C. (1997)
A Simple Method to determine Free and Glycosylated Vitamin B6 in Legumes.
J.Liq.Chrom.&Rel.Technol. 20: 957-969.
- 30 130 Simon, I., Leinert, J., & Hotzel, D. (1982)
[Methods and their evaluation in estimating the vitamin B6-status in humans. 3. Determination- of 4-pyridoxic acid in urine].
Int.J.Vitam.Nutr.Res. 52: 280-286.
- 35 131 Speitling, A. (1991) Wirkung akut und chronisch hochdosierter Vitamin B6-Gaben - Biokinetische Untersuchungen am Menschen, Diss. U Giessen
Wissenschaftlicher Fachverlag, Gießen.
- 40 132 Straub, R. H., Rokitzki, L., Schumacher, T., Hillmann, C., Palitzsch, K. D., & Scholmerich, J. (1993)
[Patients with type-II diabetes mellitus and neuropathy have no deficiency of vitamins A, E, beta-carotene, B1, B2, B6, B12 and folic acid].
Med.Klin. 88: 453-457.
- 133 Suzuki, Y., Doi, Y, Uchida, K, Tsuge, H. (1997)
Enzymatic Preparation of pyridoxine 4'-5'- α -D-Glucosides
J. Appl. Glycosci. 43 66-7;
- 45 134 Tadera, K., Katzutaka, O., & Nakahara, C. (1999)
Occurence in soybeans of a novel vitamin B6 conjugate that liberates pyridoxine by beta-glucosidase action after alkali treatment.
Biosci.Biotechnol.Biochem. 63: 213-215.

- 135 Taguchi, T., Sugiura, M., Hamada, Y., & Miwa, I. (1999)
Inhibition of advanced protein glycation by a Schiff base between aminoguanidine and pyridoxal.
European Journal of Pharmacology 378: 283-289.
- 5 136 Thakker, K. M., Sitren, H. S., Gregory, J. F., III, Schmidt, G. L., & Baumgartner, T. G. (1987)
Dosage form and formulation effects on the bioavailability of vitamin E, riboflavin, and vitamin B-6 from multivitamin preparations.
Am.J.Clin.Nutr. 45: 1472-1479.
- 10 137 Torres-Sequeiros, R. A., Garcia-Falcon, M. S., & Simal-Gandara, J. (2001)
Analysis of fluorescent vitamins riboflavin and pyridoxine in beverages with added vitamins.
Chromatographia 53: S236-S239.
- 15 138 Toukairin-Oda, T., Sakamoto, E., Hirose, N., Mori, M., Itoh, T., & Tsuge, H. (1989)
Determination of vitamin B6 derivatives in foods and biological materials by reversed-phase HPLC.
J.Nutr.Sci.Vitaminol.(Tokyo) 35: 171-180.
- 20 139 Trumbo, P. R., Banks, M. A., & Gregory, J. F., III (1990)
Hydrolysis of pyridoxine-5'-beta-D-glucoside by a broad-specificity beta-glucosidase from mammalian tissues.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 195: 240-246.
- 25 140 Trumbo, P. R. & Gregory, J. F., III (1988)
Metabolic utilization of pyridoxine-beta-glucoside in rats: influence of vitamin B-6 status and route of administration.
J.Nutr. 118: 1336-1342.
- 141 Trumbo, P. R. & Gregory, J. F., III (1989)
The fate of dietary pyridoxine-beta-glucoside in the lactating rat.
J.Nutr. 119: 36-39.
- 30 142 Trumbo, P. R., Gregory, J. F., III, & Sartain, D. B. (1988)
Incomplete utilization of pyridoxine-beta-glucoside as vitamin B-6 in the rat.
J.Nutr. 118: 170-175.
- 35 143 Tryfiates, G. P. (1996)
Adenosine-N6-diethylthioether-N1-pyridoximine 5'-phosphate. A novel marker for human cancer detection.
Anticancer Res. 16: 2201-2204.
- 40 144 Tryfiates, G. P. & Bishop, R. E. (1989)
Synthesis of adenosine-N6-methyl, propylthioether-N-pyridoxamine: an analog of a novel vitamin B6 tumor product.
In Vivo 3: 177-182.
- 145 Tryfiates, G. P., Bishop, R. E., & Murgo, A. J. (1991)
Vitamin B6 and cancer: a novel pyridoxal 5-phosphate conjugate in tumor cells and blood of cancer patients.
Anticancer Res. 11: 1281-1284.
- 45 146 Tryfiates, G. P. & Sattsangi, S. (1982)
Separation of vitamin B6 compounds by paired-ion high-performance liquid chromatography.
J.Chromatogr. 227: 181-186.

- 147 Tsuge, H., Maeno, M., Hayakawa, T., & Suzuki, Y. (1996)
Comparative study of pyridoxine-alpha, beta-glucosides, and phosphopyridoxyl-
lysine as a vitamin B6 nutrient.
J.Nutr.Sci.Vitaminol.(Tokyo) 42: 377-386.
- 5 148 Tsuge, H., Maeno, M., Nagae, K., Nohisa, C., & Hayakawa, T. (1994)
Change in blood levels of vitamin B-6 derivatives in pregnant and lactating rats.
J.Nutr.Sci.Vitaminol.(Tokyo) 40: 239-249.
- 149 Tsuge, H., Mascher, H., Mahuren, J. D., Coburn, S. P., & Metzler, E. (1997)
Vitamins and Coenzymes, vol. 280 Academic Press, New York.
- 10 150 Tsuge, H., Toshikatsu, O., & Miyata, H. (1986) Separation and determination of
vitamin B-6 Derivatives by reversed-phase HPLC.
Agric.Biol.Chem. 50: 195-197.
- 151 Ubbink, J. B., Serfontein, W. J., Becker, P. J., & de Villiers, L. S. (1987)
Effect of different levels of oral pyridoxine supplementation on plasma pyridoxal-
5'-phosphate and pyridoxal levels and urinary vitamin B-6 excretion.
15 Am.J.Clin.Nutr. 46: 78-85.
- 152 Valls, F., Sancho, M. T., Fernandez-Muino, M. A., & Checa, M. A. (2001)
Determination of vitamin B-6 in cooked sausages.
Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 38-41.
- 20 153 van de Kamp, J. L., Westrick, J. A., & Smolen, A. (1995)
B-6 vitamers concentrations in mouse plasma, erythrocytes and tissues.
Nutrition Research 15: 415-422.
- 154 van Schoonhoven, J., Schrijver, J., van den Berg, H., & Haenen, G. (1994)
Reliable and sensitive high-performance liquid chromatographic method with
25 fluorometric detection for the analysis of vitamin B-6 in foods and feeds.
J.Agric.Food Chem. 42: 1475-1480.
- 155 Vanderslice, J. T., Stewart, K. K., & Yarmas, M. M. (1979)
Liquid chromatographic separation and quantification of B6 vitamers and their
metabolite, pyridoxic acid.
30 J.Chromatogr. 176: 280-285.
- 156 Villavicencio, A. L. C. H., Mancini, J., Delincee, H., & Bognar, A. (2000)
Effect of gamma irradiation on the thiamine, riboflavin and vitamin B-6 content in
two varieties of Brazilian beans.
Radiation Physics and Chemistry 57: 299-303.
- 35 157 Weignerova, L., Suzuki, Y., Hunkova, Z., Sedmera, P., Havlicek, V., Marek, R., &
Kren, V. (1999)
Pyridoxine as a substrate for screening synthetic potential of glycosidases.
Collection of Czechoslovak Chemical Communications 64: 1325-1334.
- 158 Williams, A. K. (1979)
40 High-performance chromatography of vitamin B6.
Methods Enzymol. 62: 415-422.
- 159 Wozenski, J. R., Leklem, J. E., & Miller, L. T. (1980)
The metabolism of small doses of vitamin B-6 in men.
J.Nutr. 110: 275-285.
- 45 160 Yagi, T., Kim, Y., Hiraoka, Y., Tanouchi, A., Yamamoto, T., & Yamamoto, S.
(1996)

- Active transport activities of free B-6 vitamers in various yeast strains.
Biosci.Biotechnol.Biochem. 60: 893-897.
- 161 Zempleni, J. (1995)
Pharmacokinetics of vitamin B6 supplements in humans.
5 J.Am.Coll.Nutr. 14: 579-586.
- 162 Zempleni, J. (1997)
Biokinetic analysis of vitamin absorption and disposition in humans.
Methods Enzymol. 281: 405-425.
- 163 Zempleni, J. & Kubler, W. (1994)
10 The utilization of intravenously infused pyridoxine in humans.
Clin.Chim.Acta 229: 27-36.
- 164 Zhang, Z., Gregory, J. F., III, & McCormick, D. B. (1993)
Pyridoxine-5'-beta-D-glucoside competitively inhibits uptake of vitamin B-6 into
isolated rat liver cells.
15 J.Nutr. 123: 85-89.

7. Anhang

7.1. Allgemeines

7.1.1. Chromatogramme

- Die erste Abbildung zeigt eine mit Standards versetzte Urinprobe, die folgenden beiden
- 5 Chromatogramme wurden aus der gleichen Plasmaprobe (mit PLP angereichert) erstellt, dabei ist einmal das Bisulfit im Fließmittel durch unwirksames Sulfat ersetzt worden.

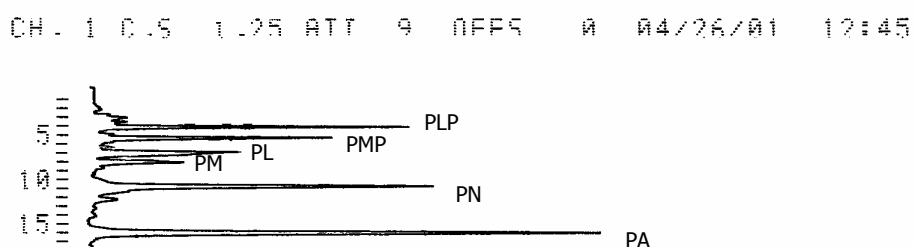
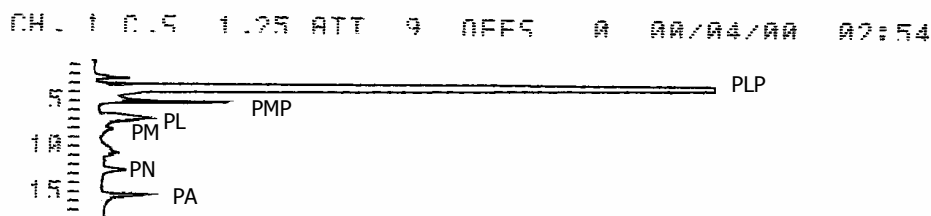


Abbildung 9: Chromatogramm einer Urinprobe (mit Standards)



10

Abbildung 10: Chromatogramm einer Plasmaprobe (mit PLP angereichert)

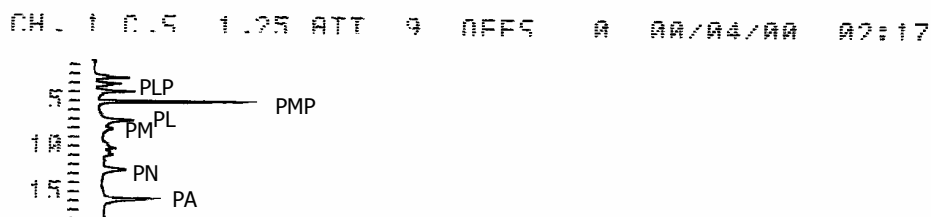


Abbildung 11: Plasmaprobe wie vorstehend, jedoch ohne Bisulfit im Fließmittel

7.1.2. Sonstige Daten

Die folgende Tabelle enthält die zur Zeit für Deutschland relevanten Zufuhrempfehlung für "Vitamin B6", welches in der Regel mit "Pyridoxinhydrochlorid" gleichgesetzt wird.

Tabelle 28 Zufuhrempfehlungen für Vitamin B6 [mg/d]

Quelle	Mann, 20 Jahre	Mann, 35 J.	Frau, 20 J.	Frau, 35 J.
DGE 2000 ⁸⁴	1,5	1,5	1,2	1,2
DGE 1991 ⁸⁵	1,8	1,8	1,6	1,6
DRI 2000 ⁸⁶	1,3	1,3	1,3	1,3
RDA 1989 ⁸⁷	2,0	2,0	1,6	1,6

5

Die Abbildungen geben Beispiele für die Einverständniserklärungen der Probanden und die entsprechenden Informationsschriften wieder. Da ausnahmslos alle Versuchspersonen Absolventen oder Mitarbeiter des Instituts für Ernährungswissenschaft waren, konnte Grundwissen vorausgesetzt werden.

**EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG
ZUR STUDIE**

Bioverfügbarkeit des Vitamin B6 aus Lebensmitteln.

Name:..... Vorname:.....
Geburtsdatum:.....

Ich bin damit einverstanden, an der biokinetischen Studie teilzunehmen.

Ich bin schriftlich und mündlich aufgeklärt worden über ihr Ziel, die praktische Durchführung, den zu erwartenden Nutzen, die möglichen Risiken und die mit ihr verbundenen Belastungen.

Über den Versicherungsschutz bin ich in verständlicher Weise informiert worden.
Ich bin berechtigt, jederzeit ohne Nachteile oder Angabe von Gründen aus der Studie auszuscheiden.

Ich bin darüber informiert worden, daß die erhaltenen Daten den Bestimmungen des Datenschutzgesetzes unterliegen. Ich stimme ihrer Veröffentlichung unter der Voraussetzung zu, daß jeder Bezug zu meiner Person unkenntlich gemacht ist.

Ich bin damit einverstanden, daß die im Rahmen der Studie erhobenen Daten aufgezeichnet, von einem zur Verschwiegenheit verpflichteten Mitarbeiter oder Beauftragten der fördernden Einrichtung eingesehen bzw. abgefragt und in anonymisierter Form an die zuständige Überwachungsbehörde oder die zuständige Bundesoberbehörde weitergegeben, wissenschaftlich ausgewertet und den gesetzlichen Bestimmungen entsprechend archiviert werden. Mir ist außerdem bekannt, daß in seltenen Ausnahmefällen und nur unter Wahrung meiner Persönlichkeitsrechte eine Weitergabe nicht anonymisierter Daten erforderlich sein kann.

Ich konnte Fragen stellen. Sie wurden zu meiner Zufriedenheit beantwortet.

Ich habe keine weiteren Fragen mehr.

Ich habe eine Kopie der schriftlichen Aufklärung und dieser Einverständniserklärung erhalten.

Ort/Datum: Giessen, im April '01

Unterschrift des Probanden:

Unterschrift des Studienleiters
bzw. seines Stellvertreters

Probandeninformation zur Teilnahme an einer biokinetischen Studie mit Vitamin B6 nach oraler Applikation

Sehr geehrter Proband, sehr geehrte Probandin,
Sie haben sich freundlicherweise bereit erklärt, an einer biokinetischen Studie zur Prüfung der Bioverfügbarkeit von gebundenem Pyridoxin (Vitamin B6) teilzunehmen.

Vitamin B6, welches zwar häufig in pflanzlichen Lebensmitteln auftritt, liegt vielfach in gebundener Form vor (Glucosid), über dessen Verfügbarkeit für den Menschen wenig bekannt ist. In der geplanten Studie soll durch Vergleich zweier Getränke (Karottensaft bzw. handelsübliches Vitamipräparat mit Wasse) geprüft werden, inwieweit VitaminB6-Glucoside aufgenommen bzw. verstoffwechselt werden können. Beide Getränke enthalten die gleiche Menge Vitamin B6, jedoch mit unterschiedlichem gebundenen Anteil. Die zugeführte Menge liegt in der Höhe der DGE Empfehlungen.

Ablauf der Studie
Jeder Proband nimmt an zwei Versuchstagen teil, an denen morgens jeweils eines der Testgetränke konsumiert wird (Trinkmenge ca. 0,4 l). Zu Beginn und in regelmäßigen Abständen während der folgenden 8 Stunden wird jeweils eine Blutprobe entnommen (Gesamtvolumen ca. 30 ml); ausserdem wird stündlich Urin gesammelt.

Während des Versuchstages werden (VitaminB6-freie) Getränke gereicht. In der Vorbereitungsphase und zwischen den beiden Versuchstagen ist es erforderlich, die Körperspeicher durch handelsübliche Vitaminpräparate aufzufüllen. Die Dosierung entspricht den Empfehlungen der DGE.

Unerwünschte Wirkungen
Bei Vitaminen in lebensmitteladäquater Menge sind Nebenwirkungen nicht bekannt.

10

Abbildung 12: Formular der Einverständniserklärung zur Studie

⁸⁴ Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr / Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) – 1.Aufl. Frankfurt/M, Unschau/Braus 2000 ISBN 3-8295-7114-3

⁸⁵ Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), Empfehlungen für die Nährstoffzufuhr, 5.Überarbeitung, Frankfurt/M, Unschau 1991 ISBN 3-524-71003-4

⁸⁶ Dietary Recommended Intake (US-FDA), tatsächliche Zufuhr lt. gleicher Quelle 2,0 mg (m), 1,3 mg (w).

⁸⁷ Recommended dietary Allowances (US-FDA)

Probanden-Leitfaden

1. Was muss ich tun...

a. vor Versuchsbeginn?

Ggf. ist es erforderlich, die Körperspeicher mit B6 aufzufüllen, dazu reicht ein handelsübliches Multivitaminpräparat mit "normaler" Dosierung für einige Tage. Jedoch keine Supplemente am letzten Tag vor Versuchsbeginn einnehmen. Abends ab ca. 22 Uhr bitte nichts mehr essen.

b. am Versuchstag?

Am Versuchstag gegen halb 9 nüchtern in der W20 erscheinen. Es wird eine Braunüle zur Venen-Blutentnahme eingesetzt (alternativ "Butterfly" zur Einmal-Entnahme, s.u.). Danach Sammlung von Nüchtern-Blut und Nüchtern-Urin. Jetzt startet der eigentliche Versuch mit dem Verzehr des Testgetränkes, anschließend werden zunächst halbstündlich, danach in grösseren Abständen kleine Blutproben entnommen. Ausserdem wird stündlich der Urin gesammelt für insgesamt 8 Stunden, abschliessend wird die Braunüle entfernt. Sie können während des Tages ganz normal arbeiten, stärkere körperliche Aktivität (bzw. sonstige starke Kreislaufanregung) hingegen ist für die Messungen schädlich und sollte unterbleiben.

c. nach dem Versuchsende?

Es müssen keine besonderen Vorschriften beachtet werden.

2. Wie funktioniert...

a. die Urinsammlung?

Urin im Messbecher auffangen, Volumen ablesen und mit Uhrzeit notieren, dann etwa 3 ml in vorbereitetes Gefäss geben, beschriften mit Initialen und Stundenzahl nach Versuchsbeginn (nüchtern = 0), also z.B. CB0, CB1, CB2 ... CB8. Der restliche Urin kann verworfen werden, die Probe bitte in das vorbereitete Hsfach stellen.

Die Urinsammlungen sollten möglichst genau im Stundenabstand erfolgen, ausserdem muss bei der Nüchternprobe die (ungefähre) Zeit seit der letzten Miktio n vermerkt werden.

b. das Trinken?

Die vorgesehene (Test-)Trinkmenge sollte in einem Zeitraum von etwa 5 (bis 10) Minuten vollständig konsumiert werden (Zeit und Volumen bitte notieren). In der nächsten Stunde sollte möglichst nichts weiter getrunken werden. Danach können B6-freie Getränke nach Belieben genommen werden, es ist jedoch darauf zu achten, an beiden Versuchstagen in etwa die gleiche Menge zu trinken.

c. die Blutentnahme?

Blut wird (wahrscheinlich) zu folgenden Zeiten (h) entnommen: 0, 0:30, 1, 1:30, 2, 3, 4, 5, 6 und 8, jeweils ca. 2-3 ml, zusammen also knapp 30ml. Das Blut wird in Heparincontainern gesammelt und unmittelbar anschliessend abzentrifugiert, um die B6-Diffusion aus den Erythrozyten zu minimieren. Daher ist es erforderlich, die Blutentnahmen in der Nähe der Kühlzentrifuge (Kellerlabor) durchzuführen. (Sie brauchen die Blutentnahme natürlich nicht selber durchzuführen!)

Bei Verwendung von Venenverweilkanülen (Braunülen) muss nur einmal "gestochen" werden zu Beginn, im Laufe des Tages steht dann ein praktischer (schmerzloser) Schraubverschluss zur Verfügung.

Es kann im Laufe des Tages ein- oder zweimal erforderlich sein, die Braunüle mit steriler Heparinlösung zu Spülen, um Verkleben zu verhindern. Das Spülen ist ebenso wie die Blutentnahmen schmerzfrei, es kann jedoch kurzzeitig ein lokales Kältegefühl auftreten, da die Spül-Lösung (Raumtemp.) etwas kühler als die

Körpertemperatur ist.

Sie müssen sich nur jeweils zu den angegebenen Zeiten im Kellerlabor einfinden und den Arm "hinhalten". Die Braunüle wird so gelegt, dass Sie im Laufe des Tages ihren Arm ganz normal bewegen können.

3. Ist der Versuch schmerzhaft?

Ja, wahnsinnig. Sie werden noch Stunden später heulend durch die Gegend laufen und nach Ihrer Mami schreien.

Jetzt mal ehrlich...

...also es gibt drei, vier Situationen, in den Sie theoretisch "etwas" spüren könnten.

("können" - nicht müssen).

1. Beim Einstechen der Braunüle in die Vene.

Ist wie eine normale Spritze, manchmal piekst es ein wenig und manchmal spürt man überhaupt nichts. Da die Vene unmittelbar unter der Haut liegt, ist das Ganze aber in weniger als einer Minute vorbei.

2. Beim Blutentnehmen kann ein leichtes Ziehen auftreten. (Vene wird durch zu grossen Unterdruck aus dem Heparincontainer zu stark komprimiert, bzw. dadurch wird zu sehr an der Braunüle gezerrt.) Hier gibt es eine einfache Abhilfe: Aua sagendann wird einfach der Unterdruck verringert und das Ziehen lässt augenblicklich nach. Im Normalfall ist die zu entnehmende Blutmenge aber so gering, dass im Heparincontainer überhaupt kein Unterdruck aufgebaut werden muss. Sie spüren also schlichtweg gar nichts.

3. Nach langer Braunülenverweildauer kann das Gewebe um die Einstichstelle irritiert werden und/oder die Braunüle kann anfangen, zu verkleben. Hier ist entsprechende Abhilfe durch Spülen (s.o.) möglich oder leichtes Verschieben (unter Aufsicht) der Braunüle.

Beim von uns geplanten Versuchsdesign ist die Liegedauer der Braunüle aber so kurz (8 Stunden), dass Komplikationen absolut nicht zu erwarten sind. Alternativ kann auch statt der Braunüle das Blut durch Einmal-Sets ("Butterfly") abgenommen werden. Nachteil hierbei ist jedoch das wiederholte Einstechen.

4. Bei Entfernen der Braunüle kann das Befestigungspflaster etwas an den Härchen ziehen, das ist - zumindest meiner Meinung nach - das schmerzhafteste an der ganzen Prozedur.

4. Gibt es sonst noch Risiken?

Da nur Lebensmittel (Karottensaft, Trinkwasser) bzw. handelsübliche Vitamina Reinsubstanz konsumiert werden und da die Dosierung exakt der DGE-Zufuhrempfehlung entspricht, sind neben den oben genannten allgemeinen Risiken der Blutentnahme keine weiteren Risiken und Nebenwirkungen bekannt.

5. Krieg ich Geld dafür?

Nein.

Abbildung 13: Formular der erweiterten Probandeninformation (Beispiel)

7.2. Messwerte

7.2.1. Kinetische Versuche

7.2.1.1. Urinvolumina

5 Tabelle 29 Urinausscheidung [ml] der Versuchspersonen (VP) während der ersten 8 Stunden der Testreihen (T).

	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6
VP01	685	660	690	715	730	650
VP02	1.050	1.130	1.200	1.085	1.320	
VP03	505	435	540	565	480	
VP04				600	555	
VP05				690	730	
VP06				765	800	
VP07				630	520	
VP08				695	750	
VP09				680	605	
VP10				1.115	1.005	
VP11				905	980	
VP12				940	860	

7.2.1.2. Konzentrationen der einzelnen B6-Formen

Die folgenden Tabellen geben die Mittelwerte der gemessenen Plasma-Konzentrationen bzw. exkretierten Mengen an B6-Formen ohne Nüchternwertbereinigung wieder.

10 Tabelle 30 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 1 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA>	<Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
0	34	5	5	0	5	5	7	7	49	49	56	56	0
30	50	4	7	1	7	9	8	10	69	71	77	81	4
75	61	7	10	1	10	13	10	15	89	92	99	107	8
120	71	9	6	1	8	11	11	16	95	98	106	114	8
165	57	5	6	1	10	10	10	14	79	79	89	93	4
210	46	7	7	1	8	8	10	10	69	69	79	79	0
270	44	5	6	1	6	6	8	8	62	62	70	70	0
330	38	5	4	0	6	6	7	7	53	53	60	60	0

Tabelle 31 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 1 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA>	<Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.	Brutto- Exkretion	Basis- Exkretion	Netto- Exkretion
0	6	4	5	0	7	7	482	482	22	22	504	504	0	0	0	0
1	9	6	2	1	48	49	660	661	66	67	726	728	2	728	504	224

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
2	6	4	7	2	88	95	808	812	107	114	915	926	11	1.654	1.008	646
3	10	5	8	1	90	101	897	903	114	125	1.011	1.028	17	2.682	1.512	1.170
4	12	6	10	2	79	84	924	1.011	109	114	1.033	1.125	92	3.807	2.016	1.791
5	8	7	5	2	57	62	822	844	79	84	901	928	27	4.735	2.520	2.215
6	6	5	5	0	43	44	706	709	59	60	765	769	4	5.504	3.024	2.480
7	7	4	6	0	20	20	598	598	37	37	635	635	0	6.139	3.528	2.611
8	5	3	4	0	6	6	474	474	18	18	492	492	0	6.631	4.032	2.599

Tabelle 32 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 02 in Testreihe 1 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.
0	45	8	4	0	7	7	4	4	64	64	68	68	0
30	50	4	5	1	7	12	5	5	67	72	72	77	5
60	89	11	6	1	10	13	8	10	117	120	125	130	5
90	97	9	8	1	9	10	6	9	124	125	130	134	4
120	83	10	9	1	10	12	8	11	113	115	121	126	5
150	69	7	13	1	8	8	7	8	98	98	105	106	1
180	56	8	11	0	7	10	6	7	82	85	88	92	4
240	53	7	6	0	6	7	6	6	72	73	78	79	1
300	49	5	8	0	6	6	8	9	68	68	76	77	1
360	48	6	5	0	7	7	6	6	66	66	72	72	0

Tabelle 33 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 02 in Testreihe 1 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
0	9	4	7	2	9	9	991	991	31	31	1.022	1.022	0	0	0	0
1	18	7	9	6	38	39	1.275	1.278	78	79	1.353	1.357	4	1.357	1.026	331
2	89	8	13	5	162	178	1.674	1.677	277	293	1.951	1.970	19	3.327	2.052	1.275
3	72	5	9	5	108	116	1.886	1.899	199	207	2.085	2.106	21	5.433	3.078	2.355
4	79	6	7	0	94	97	1.875	1.886	186	189	2.061	2.075	14	7.508	4.104	3.404
5	58	8	8	1	46	46	1.619	1.621	121	121	1.740	1.742	2	9.250	5.130	4.120
6	29	4	11	3	30	30	1.375	1.377	77	77	1.452	1.454	2	10.704	6.156	4.548
7	7	3	8	2	14	14	1.018	1.018	34	34	1.052	1.052	0	11.756	7.182	4.574
8	10	5	6	0	8	8	972	972	29	29	1.001	1.001	0	12.757	8.208	4.549

Tabelle 34 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 03 in Testreihe 1 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA>	<Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
0	37	5	5	0	2	2	8	8	49	49	57	57	0
30	41	6	7	0	7	8	10	10	61	62	71	72	1
60	58	5	7	1	10	12	10	12	81	83	91	95	4
105	51	7	8	2	8	10	11	13	76	78	87	91	4
135	57	7	6	1	7	9	9	11	78	80	87	91	4
165	85	9	5	1	6	10	8	10	106	110	114	120	6
195	69	7	4	1	6	8	8	12	87	89	95	101	6
255	54	6	7	1	6	6	7	10	74	74	81	84	3
315	49	5	5	0	6	7	8	8	65	66	73	74	1
375	45	4	3	0	5	5	7	7	57	57	64	64	0

Tabelle 35 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 03 in Testreihe 1 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA>	<Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.	Brutto- Exkretion	Basis- Exkretion	Netto- Exkretion
0	6	0	4	0	8	8	476	476	18	18	494	494	0	0	0	0
1	8	2	3	0	15	15	680	683	28	28	708	711	3	711	486	225
2	12	2	8	0	69	72	897	918	91	94	988	1.012	24	1.723	972	751
3	14	5	9	2	95	104	858	865	125	134	983	999	16	2.722	1.458	1.264
4	17	5	7	3	58	62	766	807	90	94	856	901	45	3.623	1.944	1.679
5	11	7	6	1	48	48	674	763	73	73	747	836	89	4.459	2.430	2.029
6	8	5	5	2	23	23	590	594	43	43	633	637	4	5.096	2.916	2.180
7	6	4	6	0	10	10	618	618	26	26	644	644	0	5.740	3.402	2.338
8	4	2	4	0	8	8	489	489	18	18	507	507	0	6.247	3.888	2.359

5 Tabelle 36 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 2 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA>	<Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
0	37	3	6	0	4	4	6	6	50	50	56	56	0
30	49	6	9	1	5	5	6	6	70	70	76	76	0
75	76	4	4	1	9	11	9	9	94	96	103	105	2
120	84	8	6	0	6	6	12	13	104	104	116	117	1
165	63	5	5	1	6	4	15	15	80	78	95	93	-2
210	59	7	8	2	5	5	9	9	81	81	90	90	0
270	57	6	5	1	4	4	7	7	73	73	80	80	0
330	46	4	3	0	3	3	6	6	56	56	62	62	0

Tabelle 37 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 2 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
0	5	3	6	1	5	5	490	490	20	20	510	510	0	0	0	0
1	8	6	7	2	60	61	770	770	83	84	853	854	1	854	504	350
2	5	5	9	2	92	94	1.029	1.029	113	115	1.142	1.144	2	1.998	1.008	990
3	13	8	9	4	100	105	1.078	1.197	134	139	1.212	1.336	124	3.334	1.512	1.822
4	19	7	12	5	66	66	1.136	1.185	109	109	1.245	1.294	49	4.628	2.016	2.612
5	11	5	9	3	82	82	990	1.016	110	110	1.100	1.126	26	5.754	2.520	3.234
6	8	5	8	1	54	54	870	870	76	76	946	946	0	6.700	3.024	3.676
7	6	3	5	0	32	32	665	665	46	46	711	711	0	7.411	3.528	3.883
8	4	2	4	0	10	10	499	499	20	20	519	519	0	7.930	4.032	3.898

Tabelle 38 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 02 in Testreihe 2 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.
0	47	5	5	0	5	5	5	5	62	62	67	67	0
30	65	7	8	0	15	16	6	6	95	96	101	102	1
75	113	17	9	0	9	9	11	11	148	148	159	159	0
120	108	14	7	0	10	11	13	15	139	140	152	155	3
165	87	9	6	0	9	9	11	13	111	111	122	124	2
210	72	8	5	1	8	8	10	10	94	94	104	104	0
270	59	6	7	0	6	6	9	9	78	78	87	87	0
330	55	5	6	0	5	5	8	8	71	71	79	79	0
390	48	5	5	0	6	6	5	5	64	64	69	69	0

5 Tabelle 39 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 02 in Testreihe 2 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
0	10	3	5	0	7	7	978	978	25	25	1.003	1.003	0	0	0	0
1	21	7	14	2	41	41	1.307	1.318	85	85	1.392	1.403	11	1.403	1.026	377
2	83	8	21	6	240	244	1.674	1.777	358	362	2.032	2.139	107	3.542	2.052	1.490
3	99	12	36	9	509	516	1.698	1.712	665	672	2.363	2.384	21	5.926	3.078	2.848
4	87	4	22	7	561	598	1.669	1.681	681	718	2.350	2.399	49	8.325	4.104	4.221
5	78	5	13	4	422	447	1.505	1.509	522	547	2.027	2.056	29	10.381	5.130	5.251
6	44	3	8	3	317	317	1.474	1.474	375	375	1.849	1.849	0	12.230	6.156	6.074
7	19	2	7	5	113	113	1.281	1.281	146	146	1.427	1.427	0	13.657	7.182	6.475
8	12	2	7	4	68	68	1.049	1.049	93	93	1.142	1.142	0	14.799	8.208	6.591

Tabelle 40 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 03 in Testreihe 2 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA>	<Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
0	42	6	5	0	3	3	5	5	56	56	61	61	0
30	43	5	6	1	4	4	11	11	59	59	70	70	0
75	69	7	4	0	5	6	12	13	85	86	97	99	2
120	85	8	7	1	11	13	14	14	112	114	126	128	2
165	60	4	5	1	7	8	10	10	77	78	87	88	1
210	51	5	4	0	4	4	9	9	64	64	73	73	0
270	43	7	8	0	5	6	8	8	63	64	71	72	2
330	46	6	5	0	4	5	8	8	61	62	69	70	1
390	45	4	5	0	4	4	7	7	58	58	65	65	0

Tabelle 41 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 03 in Testreihe 2 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA>	<Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
0	5	1	6	0	8	8	490	490	20	20	510	510	0	0	0	0
1	7	1	7	0	21	21	855	874	36	36	891	910	19	910	480	430
2	18	2	10	2	79	81	1.004	1.031	111	113	1.115	1.144	29	2.054	960	1.094
3	23	4	14	3	85	96	1.039	1.102	129	140	1.168	1.242	74	3.296	1.440	1.856
4	25	5	12	2	104	119	1.056	1.074	148	163	1.204	1.237	33	4.533	1.920	2.613
5	22	6	11	3	70	74	983	980	112	116	1.095	1.096	1	5.629	2.400	3.229
6	8	11	10	8	46	47	882	888	83	84	965	972	7	6.601	2.880	3.721
7	9	5	8	3	20	21	649	648	45	46	694	694	0	7.295	3.360	3.935
8	7	2	6	1	11	12	513	513	27	28	540	541	1	7.836	3.840	3.996

5 Tabelle 42 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 3 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA>	<Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
0	34	4	3	1	4	4	2	2	46	46	48	48	0
30	60	8	8	2	13	13	5	5	91	91	96	96	0
60	71	10	11	4	14	14	8	8	110	110	118	118	0
90	83	7	14	3	9	9	6	6	116	116	122	122	0
120	58	5	10	3	8	8	8	8	84	84	92	92	0
150	55	4	9	2	5	5	6	6	75	75	81	81	0
180	46	4	6	2	3	3	4	4	61	61	65	65	0
240	38	4	5	1	4	4	5	5	52	52	57	57	0

Tabelle 43 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 3 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
0	5	1	4	0	8	8	486	486	18	18	504	504	0	0	0	0
1	14	4	11	0	23	23	800	800	52	52	852	852	0	852	530	322
2	55	6	16	1	93	93	1.269	1.269	171	171	1.440	1.440	0	2.292	1.060	1.232
3	88	4	12	2	88	88	1.128	1.128	194	194	1.322	1.322	0	3.614	1.590	2.024
4	61	5	8	3	101	101	914	914	178	178	1.092	1.092	0	4.706	2.120	2.586
5	48	3	6	1	64	64	910	910	122	122	1.032	1.032	0	5.738	2.650	3.088
6	42	4	8	1	55	55	857	857	110	110	967	967	0	6.705	3.180	3.525
7	30	2	5	1	27	27	755	755	65	65	820	820	0	7.525	3.710	3.815
8	18	2	6	1	25	25	662	662	52	52	714	714	0	8.239	4.240	3.999
9	11	1	3	0	18	18	518	518	33	33	551	551	0	8.790	4.770	4.020

Tabelle 44 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 02 in Testreihe 3 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.
0	45	5	4	0	3	3	5	5	57	57	62	62	0
60	108	7	10	2	8	8	7	7	135	135	142	142	0
90	84	6	7	1	8	8	10	10	106	106	116	116	0
120	67	4	6	1	6	6	8	8	84	84	92	92	0
180	58	2	4	0	5	5	6	6	69	69	75	75	0
240	44	3	5	0	4	4	5	5	56	56	61	61	0

5

Tabelle 45 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 02 in Testreihe 3 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
0	8	0	3	0	10	10	1.058	1.058	21	21	1.079	1.079	0	0	0	0
1	61	0	10	0	81	81	1.599	1.599	152	152	1.751	1.751	0	1.751	1.026	725
2	119	0	24	0	244	244	1.976	1.976	387	387	2.363	2.363	0	4.114	2.052	2.062
3	133	0	37	0	736	736	2.123	2.123	906	906	3.029	3.029	0	7.143	3.078	4.065
4	79	0	25	0	669	669	2.474	2.474	773	773	3.247	3.247	0	10.390	4.104	6.286
5	75	0	18	0	468	468	2.063	2.063	561	561	2.624	2.624	0	13.014	5.130	7.884
6	68	0	14	0	298	298	1.872	1.872	380	380	2.252	2.252	0	15.266	6.156	9.110
7	45	0	10	0	156	156	1.490	1.490	211	211	1.701	1.701	0	16.967	7.182	9.785

Tabelle 46 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 03 in Testreihe 3 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA>	<Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
0	33	3	2	0	3	3	6	6	41	41	47	47	0
60	42	5	5	0	5	5	7	7	57	57	64	64	0
90	64	5	7	0	4	4	10	10	80	80	90	90	0
120	48	4	6	0	3	3	8	8	61	61	69	69	0
180	43	3	5	0	4	4	8	8	55	55	63	63	0
240	37	4	4	0	4	4	6	6	49	49	55	55	0

Tabelle 47 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 03 in Testreihe 3 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA>	<Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.	Brutto- Exkretion	Basis- Exkretion	Netto- Exkretion
0	5	0	3	0	9	9	470	470	17	17	487	487	0	0	0	0
1	12	0	5	0	40	40	717	717	57	57	774	774	0	774	486	288
2	31	0	8	0	127	127	1.084	1.084	166	166	1.250	1.250	0	2.024	972	1.052
3	38	0	8	0	70	70	947	947	116	116	1.063	1.063	0	3.087	1.458	1.629
4	24	0	7	0	63	63	1.067	1.067	94	94	1.161	1.161	0	4.248	1.944	2.304
5	19	0	9	0	52	52	852	852	80	80	932	932	0	5.180	2.430	2.750
6	17	0	6	0	32	32	785	785	55	55	840	840	0	6.020	2.916	3.104
7	8	0	2	0	18	18	538	538	28	28	566	566	0	6.586	3.402	3.184

5 Tabelle 48 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 4 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA>	<Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
0	31	3	2	1	2	2	3	3	39	39	42	42	0
15	42	6	3	1	6	6	5	5	58	58	63	63	0
30	54	7	5	2	10	10	7	7	78	78	85	85	0
45	78	10	6	2	14	14	9	9	110	110	119	119	0
60	86	9	8	3	8	8	10	10	114	114	124	124	0
75	94	10	8	4	10	10	11	11	126	126	137	137	0
90	84	8	10	2	8	8	7	7	112	112	119	119	0
105	77	7	8	3	7	7	8	8	102	102	110	110	0
120	71	6	6	2	6	6	6	6	91	91	97	97	0
150	60	5	9	1	5	5	5	5	80	80	85	85	0
180	49	3	4	1	5	5	5	5	62	62	67	67	0
240	54	4	3	0	4	4	4	4	65	65	69	69	0
300	37	3	3	0	3	3	4	4	46	46	50	50	0
360	32	3	2	0	3	3	4	4	40	40	44	44	0
420	35	4	3	0	4	2	5	5	46	44	51	49	-2
480	33	3	3	0	3	3	5	5	42	42	47	47	0

Tabelle 49 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 4 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
0	6	0	5	0	10	10	501	501	21	21	522	522	0	0	0	0
1	19	2	17	1	41	41	860	860	80	80	940	940	0	940	504	436
2	37	4	15	2	128	128	1.462	1.462	186	186	1.648	1.648	0	2.588	1.008	1.580
3	92	5	11	1	87	87	1.255	1.255	196	196	1.451	1.451	0	4.039	1.512	2.527
4	45	3	9	1	73	73	1.043	1.043	131	131	1.174	1.174	0	5.213	2.016	3.197
5	42	2	3	1	54	54	906	906	102	102	1.008	1.008	0	6.221	2.520	3.701
6	61	2	6	1	96	96	1.011	1.011	166	166	1.177	1.177	0	7.398	3.024	4.374
7	58	1	5	0	71	71	845	845	135	135	980	980	0	8.378	3.528	4.850
8	34	1	2	1	50	50	763	763	88	88	851	851	0	9.229	4.032	5.197
9	20	0	6	0	28	28	528	528	54	54	582	582	0	9.811	4.536	5.275

Tabelle 50 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 02 in Testreihe 4 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.
0	43	4	3	0	2	2	3	3	52	52	55	55	0
30	52	5	6	0	4	4	3	3	67	67	70	70	0
60	92	7	8	1	6	6	4	4	114	114	118	118	0
90	78	6	5	0	5	5	5	5	94	94	99	99	0
120	66	6	4	1	4	4	5	5	81	81	86	86	0
150	63	5	6	0	4	4	3	3	78	78	81	81	0
180	56	3	3	0	3	3	4	4	65	65	69	69	0
240	47	4	4	0	2	2	4	4	57	57	61	61	0
300	42	2	4	0	1	1	4	4	49	49	53	53	0
360	40	3	3	0	2	2	4	4	48	48	52	52	0
420	42	4	3	0	3	3	3	3	52	52	55	55	0

5 Tabelle 51 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 02 in Testreihe 4 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
0	6	0	1	1	8	8	1.040	1.040	16	16	1.056	1.056	0	0	0	0
1	54	2	9	3	408	408	1.233	1.233	476	476	1.708	1.708	0	1.708	1.026	682
2	111	5	15	5	876	876	1.400	1.400	1.012	1.012	2.412	2.412	0	4.121	2.052	2.069
3	118	6	29	4	914	914	1.614	1.614	1.071	1.071	2.686	2.686	0	6.806	3.078	3.728
4	88	4	18	4	554	554	1.798	1.798	669	669	2.467	2.467	0	9.273	4.104	5.169
5	68	3	16	5	273	273	1.268	1.268	366	366	1.633	1.633	0	10.907	5.130	5.777
6	75	1	9	3	155	155	1.281	1.281	243	243	1.524	1.524	0	12.430	6.156	6.274
7	39	0	11	2	240	240	1.185	1.185	293	293	1.477	1.477	0	13.907	7.182	6.725
8	12	0	13	1	96	96	1.164	1.164	122	122	1.286	1.286	0	15.194	8.208	6.986
9	7	0	2	1	25	25	1.050	1.050	35	35	1.085	1.085	0	16.279	9.234	7.045

Tabelle 52 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 03 in Testreihe 4 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA>	<Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
0	29	4	3	0	2	2	5	5	38	38	42	42	0
30	30	5	5	0	2	2	6	6	42	42	48	48	0
60	46	7	6	0	6	6	6	6	64	64	70	70	0
90	69	7	7	0	6	6	8	8	89	89	97	97	0
120	66	5	5	0	4	4	11	11	80	80	91	91	0
150	63	4	5	0	4	4	8	8	76	76	84	84	0
180	56	4	4	0	3	3	9	9	67	67	75	75	0
240	47	4	4	0	3	3	7	7	58	58	65	65	0
300	37	4	3	0	3	3	6	6	46	46	52	52	0
360	30	3	3	0	2	2	5	5	39	39	44	44	0
420	32	4	5	0	3	3	5	5	44	44	49	49	0

Tabelle 53 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 03 in Testreihe 4 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA>	<Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.	Brutto- Exkretion	Basis- Exkretion	Netto- Exkretion
0	3	1	2	0	3	3	462	462	9	9	471	471	0	0	0	0
1	16	4	6	1	96	96	898	898	123	123	1.021	1.021	0	1.021	486	535
2	24	7	12	1	221	221	1.401	1.401	265	265	1.666	1.666	0	2.687	972	1.715
3	48	7	16	1	184	184	1.242	1.242	256	256	1.498	1.498	0	4.185	1.458	2.727
4	36	5	13	0	115	115	1.277	1.277	169	169	1.446	1.446	0	5.631	1.944	3.687
5	25	3	9	0	52	52	947	947	89	89	1.036	1.036	0	6.667	2.430	4.237
6	17	2	5	1	48	48	880	880	73	73	953	953	0	7.620	2.916	4.704
7	11	1	3	0	38	38	674	674	53	53	727	727	0	8.347	3.402	4.945
8	14	0	1	0	13	13	529	529	28	28	557	557	0	8.904	3.888	5.016
9	7	0	2	0	4	4	482	482	13	13	495	495	0	9.399	4.374	5.025

5

Tabelle 54 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 04 in Testreihe 4 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA>	<Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
0	34	5	4	0	2	2	6	6	45	45	51	51	0
30	36	6	5	0	3	3	7	7	51	51	58	58	0
60	50	7	7	0	7	7	7	7	70	70	77	77	0
90	87	9	8	1	8	8	11	11	112	112	123	123	0
120	70	6	6	1	5	5	10	10	88	88	97	97	0
150	76	5	6	1	4	4	11	11	92	92	102	102	0
180	58	4	5	0	4	4	13	13	70	70	83	83	0
240	50	5	5	0	3	3	8	8	63	63	71	71	0

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	Vitamin <vitamin B6+PA>	Vitamin <vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
300	44	5	3	0	3	3	7	7	55	55	62	62	0
360	36	4	4	0	2	2	6	6	46	46	53	53	0
420	38	5	5	0	3	3	5	5	51	51	56	56	0

Tabelle 55 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 04 in Testreihe 4 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	Vitamin <vitamin B6+PA>	Vitamin <vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.	Brutto- Exkretion	Basis- Exkretion	Netto- Exkretion
0	5	1	2	1	4	4	550	550	13	13	563	563	0	0	0	0
1	47	8	5	4	77	77	903	903	141	141	1.044	1.044	0	1.044	558	486
2	82	7	11	7	199	199	1.384	1.384	306	306	1.690	1.690	0	2.734	1.116	1.618
3	63	4	7	3	158	158	1.143	1.143	235	235	1.378	1.378	0	4.112	1.674	2.438
4	62	3	9	2	143	143	1.264	1.264	219	219	1.483	1.483	0	5.595	2.232	3.363
5	54	2	4	3	120	120	1.022	1.022	183	183	1.205	1.205	0	6.800	2.790	4.010
6	32	2	5	2	95	95	893	893	136	136	1.029	1.029	0	7.829	3.348	4.481
7	25	3	3	1	76	76	764	764	108	108	872	872	0	8.701	3.906	4.795
8	14	1	4	0	40	40	616	616	59	59	675	675	0	9.376	4.464	4.912
9	8	2	3	2	18	18	538	538	33	33	571	571	0	9.947	5.022	4.925

Tabelle 56 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 05 in Testreihe 4 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	Vitamin <vitamin B6+PA>	Vitamin <vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
0	31	5	4	0	2	2	6	6	41	41	46	46	0
30	33	6	5	0	3	3	8	8	46	46	54	54	0
60	57	6	6	0	6	6	9	9	75	75	84	84	0
90	74	7	7	0	7	7	10	10	96	96	106	106	0
120	79	5	5	0	5	5	9	9	94	94	102	102	0
150	60	5	5	0	4	4	7	7	74	74	81	81	0
180	56	4	4	0	3	3	7	7	67	67	73	73	0
240	42	4	5	0	3	3	6	6	54	54	60	60	0
300	34	4	3	0	3	3	5	5	44	44	49	49	0
360	30	3	4	0	2	2	5	5	39	39	44	44	0
420	34	4	4	0	4	4	5	5	46	46	51	51	0

Tabelle 57 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 05 in Testreihe 4 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA>frei	<Vitamin B6+PA>total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
0	8	0	2	1	6	6	417	417	17	17	434	434	0	0	0	0
1	29	1	5	2	156	156	1.102	1.102	193	193	1.295	1.295	0	1.295	436	859
2	67	2	6	4	228	228	1.216	1.216	307	307	1.523	1.523	0	2.818	872	1.946
3	82	5	14	2	164	164	987	987	267	267	1.254	1.254	0	4.072	1.308	2.764
4	54	3	8	1	108	108	932	932	174	174	1.106	1.106	0	5.178	1.744	3.434
5	67	1	4	0	94	94	1.049	1.049	166	166	1.215	1.215	0	6.393	2.180	4.213
6	38	1	3	0	60	60	991	991	102	102	1.093	1.093	0	7.486	2.616	4.870
7	24	1	1	1	11	11	774	774	38	38	812	812	0	8.298	3.052	5.246
8	3	2	2	0	5	5	485	485	12	12	497	497	0	8.795	3.488	5.307
9	7	1	3	0	8	8	426	426	19	19	445	445	0	9.240	3.924	5.316

Tabelle 58 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 06 in Testreihe 4 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA>frei	<Vitamin B6+PA>total	Ges.-B6 gebund.
0	27	4	3	0	1	1	4	4	36	36	40	40	0
30	29	5	4	0	2	2	6	6	40	40	46	46	0
60	43	7	6	0	5	5	15	15	61	61	76	76	0
90	65	6	6	0	6	6	12	12	84	84	96	96	0
120	63	5	4	0	4	4	10	10	76	76	86	86	0
150	60	4	4	0	3	3	10	10	72	72	82	82	0
180	53	4	4	0	3	3	7	7	63	63	70	70	0
240	45	4	4	0	3	3	8	8	55	55	63	63	0
300	35	4	3	0	3	3	6	6	44	44	50	50	0
360	29	3	3	0	2	2	6	6	37	37	43	43	0
420	31	5	4	0	3	3	5	5	43	43	48	48	0

5 Tabelle 59 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 06 in Testreihe 4 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA>frei	<Vitamin B6+PA>total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
0	3	0	1	1	2	2	370	370	7	7	377	377	0	0	0	0
1	23	1	3	2	34	34	835	835	63	63	898	898	0	898	374	524
2	44	2	8	3	79	79	1.072	1.072	136	136	1.208	1.208	0	2.106	748	1.358
3	36	5	17	4	102	102	1.016	1.016	164	164	1.180	1.180	0	3.286	1.122	2.164
4	27	7	3	2	84	84	922	922	123	123	1.045	1.045	0	4.331	1.496	2.835
5	24	3	2	2	63	63	841	841	94	94	935	935	0	5.266	1.870	3.396
6	18	2	0	1	59	59	712	712	80	80	792	792	0	6.058	2.244	3.814
7	13	1	1	0	47	47	554	554	62	62	616	616	0	6.674	2.618	4.056
8	9	0	2	0	30	30	505	505	41	41	546	546	0	7.220	2.992	4.228

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
9	4	1	1	0	12	12	391	391	18	18	409	409	0	7.629	3.366	4.263

Tabelle 60 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 07 in Testreihe 4 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.
0	32	5	4	0	2	2	5	5	42	42	47	47	0
30	44	6	5	0	3	3	6	6	57	57	63	63	0
60	51	8	6	0	6	6	7	7	72	72	79	79	0
90	77	7	8	0	7	7	7	7	99	99	106	106	0
120	74	5	5	0	5	5	8	8	89	89	98	98	0
150	71	5	5	0	4	4	7	7	85	85	92	92	0
180	63	4	4	0	3	3	7	7	74	74	81	81	0
240	53	4	5	0	3	3	6	6	65	65	71	71	0
300	41	4	3	0	3	3	5	5	52	52	56	56	0
360	34	3	4	0	2	2	5	5	43	43	48	48	0
420	31	5	3	0	1	2	6	6	40	41	46	47	1

Tabelle 61 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 07 in Testreihe 4 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
0	4	0	1	0	2	2	420	420	7	7	427	427	0	0	0	0
1	13	1	2	6	99	99	687	687	121	121	808	808	0	808	443	365
2	37	2	4	6	74	74	940	940	123	123	1.063	1.063	0	1.871	886	985
3	58	3	6	5	103	103	1.101	1.101	175	175	1.276	1.276	0	3.147	1.329	1.818
4	46	2	5	4	112	112	1.382	1.382	169	169	1.551	1.551	0	4.698	1.772	2.926
5	34	3	4	3	86	86	1.068	1.068	130	130	1.198	1.198	0	5.896	2.215	3.681
6	26	2	8	6	69	69	877	877	111	111	988	988	0	6.884	2.658	4.226
7	17	1	2	2	54	54	617	617	76	76	693	693	0	7.577	3.101	4.476
8	12	1	4	3	22	22	562	562	42	42	604	604	0	8.181	3.544	4.637
9	7	0	1	1	4	4	430	430	13	13	443	443	0	8.624	3.987	4.637

5

Tabelle 62 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 08 in Testreihe 4 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.
0	31	5	4	0	2	2	5	5	41	41	46	46	0
30	38	6	5	0	3	3	3	3	52	52	55	55	0

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	Vitamin total <Vitamin B6+PA>	Vitamin total <Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
60	50	8	6	0	6	6	5	5	71	71	75	75	0
90	76	7	7	0	7	7	6	6	97	97	103	103	0
120	73	5	5	0	5	5	9	9	88	88	96	96	0
150	70	5	5	0	4	4	6	6	83	83	89	89	0
180	62	4	4	0	3	3	5	5	73	73	78	78	0
240	52	4	5	0	3	3	5	5	64	64	69	69	0
300	40	4	3	0	3	3	5	5	51	51	55	55	0
360	33	3	4	0	2	2	5	5	43	43	47	47	0
420	33	4	5	0	3	3	4	4	45	45	49	49	0

Tabelle 63 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 06 in Testreihe 4 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	Vitamin total <Vitamin B6+PA>	Vitamin total <Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.	Brutto- Exkretion	Basis- Exkretion	Netto- Exkretion
0	5	0	2	1	6	6	463	463	14	14	477	477	0	0	0	0
1	45	1	6	9	85	85	1.289	1.289	146	146	1.435	1.435	0	1.435	457	978
2	73	5	13	5	227	227	1.318	1.318	323	323	1.641	1.641	0	3.076	914	2.162
3	32	4	19	8	113	113	1.179	1.179	176	176	1.355	1.355	0	4.431	1.371	3.060
4	34	3	14	6	74	74	1.445	1.445	131	131	1.576	1.576	0	6.007	1.828	4.179
5	29	5	13	4	28	28	1.278	1.278	79	79	1.357	1.357	0	7.364	2.285	5.079
6	25	3	8	5	23	23	961	961	64	64	1.025	1.025	0	8.389	2.742	5.647
7	19	1	3	2	15	15	668	668	40	40	708	708	0	9.097	3.199	5.898
8	13	1	2	5	7	7	492	492	28	28	520	520	0	9.617	3.656	5.961
9	8	0	3	3	7	7	459	459	21	21	480	480	0	10.097	4.113	5.984

Tabelle 64 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 09 in Testreihe 4 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	Vitamin total <Vitamin B6+PA>	Vitamin total <Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
0	39	4	5	0	3	3	6	6	51	51	56	56	0
30	50	5	5	0	9	9	5	5	68	68	73	73	0
60	58	7	6	0	10	10	6	6	80	80	86	86	0
90	89	9	6	0	9	9	7	7	112	112	119	119	0
120	100	8	6	0	8	8	6	6	121	121	127	127	0
150	74	7	5	0	8	8	14	14	93	93	107	107	0
180	65	6	6	0	7	7	10	10	83	83	93	93	0
240	52	7	3	0	6	6	8	8	68	68	76	76	0
300	48	6	3	0	5	5	8	8	63	63	70	70	0
360	39	6	4	0	5	5	7	7	53	53	60	60	0
480	43	5	6	0	4	4	5	5	58	58	63	63	0

Tabelle 65 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 09 in Testreihe 4 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
0	17	2	4	1	9	9	878	878	33	33	911	911	0	0	0	0
1	29	3	7	5	68	68	1.734	1.734	112	112	1.846	1.846	0	1.846	933	913
2	38	6	17	4	116	116	1.908	1.908	181	181	2.089	2.089	0	3.935	1.866	2.069
3	69	9	14	4	123	123	1.743	1.743	219	219	1.962	1.962	0	5.897	2.799	3.098
4	74	8	11	2	96	96	1.565	1.565	191	191	1.756	1.756	0	7.653	3.732	3.921
5	58	4	10	3	74	74	1.399	1.399	149	149	1.548	1.548	0	9.201	4.665	4.536
6	52	2	9	2	73	73	1.243	1.243	138	138	1.381	1.381	0	10.582	5.598	4.984
7	46	3	10	2	55	55	1.141	1.141	116	116	1.257	1.257	0	11.839	6.531	5.308
8	28	2	8	1	21	21	1.016	1.016	60	60	1.076	1.076	0	12.915	7.464	5.451
9	21	1	5	0	11	11	903	903	38	38	941	941	0	13.856	8.397	5.459

Tabelle 66 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 10 in Testreihe 4 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.
0	36	3	3	1	4	4	3	3	46	46	49	49	0
30	44	11	5	1	7	7	5	5	67	67	72	72	0
60	67	7	6	2	4	4	5	5	84	84	89	89	0
90	82	5	7	2	7	7	6	6	102	102	109	109	0
120	70	6	8	3	6	6	15	15	92	92	108	108	0
150	60	7	5	2	8	8	11	11	82	82	93	93	0
180	49	5	6	3	8	8	10	10	70	70	80	80	0
240	39	5	5	3	6	6	8	8	57	57	65	65	0
300	33	4	4	3	6	6	7	7	50	50	57	57	0
360	35	3	4	3	4	4	5	5	48	48	53	53	0
420	36	6	3	2	5	4	4	4	52	51	56	55	-1

5 Tabelle 67 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 10 in Testreihe 4 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
0	9	0	2	0	11	11	623	623	22	22	645	645	0	0	0	0
1	38	1	8	2	161	161	1.412	1.412	210	210	1.622	1.622	0	1.622	645	977
2	79	1	11	3	347	347	1.686	1.686	441	441	2.127	2.127	0	3.749	1.290	2.459
3	84	1	7	3	228	228	1.349	1.349	323	323	1.672	1.672	0	5.421	1.935	3.486
4	62	0	4	3	167	167	1.074	1.074	236	236	1.310	1.310	0	6.731	2.580	4.151
5	53	1	3	2	101	101	922	922	160	160	1.082	1.082	0	7.813	3.225	4.588
6	19	2	2	3	82	82	855	855	108	108	963	963	0	8.776	3.870	4.906
7	11	1	5	2	65	65	806	806	84	84	890	890	0	9.666	4.515	5.151

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
8	17	0	2	1	19	19	716	716	39	39	755	755	0	10.421	5.160	5.261
9	10	0	3	1	13	13	639	639	27	27	666	666	0	11.087	5.805	5.282

Tabelle 68 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 11 in Testreihe 4 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.
0	32	3	2	0	5	5	4	4	43	43	47	47	0
30	43	4	2	0	10	10	5	5	59	59	64	64	0
60	55	6	3	0	7	7	5	5	71	71	77	77	0
90	87	11	3	2	7	7	7	7	109	109	115	115	0
120	79	9	4	1	5	5	8	8	97	97	105	105	0
150	63	7	3	0	5	5	9	9	79	79	88	88	0
180	55	6	3	0	5	5	7	7	68	68	75	75	0
240	43	7	4	0	4	4	6	6	57	57	62	62	0
300	29	4	3	0	4	4	5	5	40	40	45	45	0
360	29	5	3	0	4	4	5	5	41	41	46	46	0
420	33	4	3	0	6	6	4	4	46	46	50	50	0

Tabelle 69 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 11 in Testreihe 4 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
0	4	7	2	0	2	2	596	596	15	15	611	611	0	0	0	0
1	25	5	4	0	664	664	853	853	698	698	1.551	1.551	0	1.551	618	933
2	111	16	13	1	345	345	1.336	1.336	486	486	1.822	1.822	0	3.373	1.236	2.137
3	79	14	9	2	187	187	1.042	1.042	291	291	1.333	1.333	0	4.706	1.854	2.852
4	36	8	6	0	96	96	688	688	146	146	834	834	0	5.540	2.472	3.068
5	14	6	5	0	51	51	643	643	76	76	719	719	0	6.259	3.090	3.169
6	7	5	8	0	38	38	704	704	58	58	762	762	0	7.021	3.708	3.313
7	6	6	4	0	12	12	656	656	28	28	684	684	0	7.705	4.326	3.379
8	7	4	5	0	26	26	637	637	42	42	679	679	0	8.384	4.944	3.440
9	4	5	3	0	10	10	605	605	22	22	627	627	0	9.011	5.562	3.449

5

Tabelle 70 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 12 in Testreihe 4 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.
0	43	5	4	0	4	4	7	7	57	57	63	63	0

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	Vitamin <vitamin B6+PA>	Vitamin <vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
30	49	7	6	0	6	6	7	7	66	66	73	73	0
60	89	8	7	0	8	8	7	7	111	111	118	118	0
90	92	9	8	0	5	5	7	7	115	115	122	122	0
120	74	10	9	0	7	7	14	14	101	101	115	115	0
150	57	7	6	0	6	6	19	19	76	76	95	95	0
180	59	7	5	0	5	5	18	18	75	75	93	93	0
240	53	7	5	0	5	5	11	11	70	70	81	81	0
300	42	5	4	0	5	5	9	9	55	55	64	64	0
360	43	5	4	0	4	4	7	7	56	56	63	63	0
420	44	5	4	0	5	5	7	7	58	58	65	65	0

Tabelle 71 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 12 in Testreihe 4 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	Vitamin <vitamin B6+PA>	Vitamin <vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.	Brutto- Exkretion	Basis- Exkretion	Netto- Exkretion
0	5	2	3	1	12	12	717	717	23	23	740	740	0	0	0	0
1	18	0	5	4	64	64	780	780	91	91	871	871	0	871	731	140
2	34	1	7	2	812	812	1.436	1.436	856	856	2.292	2.292	0	3.163	1.462	1.701
3	81	2	11	8	367	367	1.609	1.609	469	469	2.078	2.078	0	5.241	2.193	3.048
4	39	4	17	9	249	249	1.445	1.445	318	318	1.763	1.763	0	7.004	2.924	4.080
5	21	0	4	7	218	218	1.313	1.313	250	250	1.563	1.563	0	8.567	3.655	4.912
6	11	1	6	7	162	162	1.167	1.167	187	187	1.354	1.354	0	9.921	4.386	5.535
7	6	1	9	6	104	104	1.008	1.008	126	126	1.134	1.134	0	11.055	5.117	5.938
8	3	2	5	5	52	52	824	824	67	67	891	891	0	11.946	5.848	6.098
9	8	1	2	4	21	21	730	730	36	36	766	766	0	12.712	6.579	6.133

Tabelle 72 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 5 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	Vitamin <vitamin B6+PA>	Vitamin <vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
0	31	3	2	0	2	2	5	5	38	38	43	43	0
15	37	4	3	1	6	6	6	6	51	51	57	57	0
30	43	4	2	0	4	4	6	7	53	53	59	60	1
45	48	5	4	2	6	6	7	9	65	65	72	74	2
60	51	5	3	1	5	5	8	9	65	65	73	74	1
75	82	6	6	3	6	7	7	9	103	104	110	113	3
90	88	5	10	2	9	9	9	10	114	114	123	124	1
105	86	8	7	2	11	11	9	13	114	114	123	127	4
120	70	9	5	1	8	9	8	12	93	94	101	106	5
150	63	7	4	1	8	8	8	9	83	83	91	92	1
180	75	5	6	0	8	8	9	9	94	94	103	103	0

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	Vitamin total <Vitamin B6+PA>	Vitamin total <Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
240	67	4	6	0	5	5	9	9	82	82	91	91	0
300	41	4	4	0	4	4	6	6	53	53	59	59	0
360	38	4	2	0	2	2	5	5	46	46	51	51	0
420	32	5	3	0	3	3	7	7	43	43	50	50	0
480	34	3	2	0	3	3	5	5	42	42	47	47	0

Tabelle 73 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 5 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	Vitamin total <Vitamin B6+PA>	Vitamin total <Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.	Brutto- Exkretion	Basis- Exkretion	Netto- Exkretion
0	9	0	3	0	8	8	497	497	20	20	517	517	0	0	0	0
1	14	1	5	0	38	42	966	971	58	62	1.024	1.033	9	1.033	504	529
2	36	0	6	1	102	130	989	1.054	145	173	1.134	1.227	93	2.260	1.008	1.252
3	84	1	9	1	91	112	1.134	1.283	186	207	1.320	1.490	170	3.750	1.512	2.238
4	62	0	8	1	75	80	1.072	1.101	146	151	1.218	1.252	34	5.002	2.016	2.986
5	49	1	4	1	62	69	900	905	117	124	1.017	1.029	12	6.031	2.520	3.511
6	33	1	5	1	55	58	775	784	95	98	870	882	12	6.913	3.024	3.889
7	21	1	6	1	33	33	883	966	62	62	945	1.028	83	7.941	3.528	4.413
8	13	0	4	0	16	16	515	526	33	33	548	559	11	8.500	4.032	4.468
9	10	0	5	0	17	17	499	499	32	32	531	531	0	9.031	4.536	4.495

Tabelle 74 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 02 in Testreihe 5 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	Vitamin total <Vitamin B6+PA>	Vitamin total <Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
0	49	6	4	0	3	3	4	4	62	62	65	66	1
30	52	11	5	0	3	4	5	5	71	71	76	76	1
60	76	27	9	0	4	5	7	8	115	116	122	124	2
90	102	15	8	1	6	7	5	8	132	133	137	141	3
120	82	10	8	2	6	7	8	10	108	109	116	119	3
150	60	9	8	1	5	6	7	7	83	84	90	91	1
180	66	7	7	0	5	5	7	7	85	85	92	92	0
240	55	6	7	0	4	4	6	6	71	71	76	77	0
300	47	9	6	0	4	4	4	5	66	66	70	71	1
360	42	4	5	0	3	3	5	5	54	54	59	59	0
480	46	7	6	0	4	5	4	4	63	64	67	68	1

Tabelle 75 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 02 in Testreihe 5 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
0	8	1	2	0	5	5	1.038	1.038	16	16	1.054	1.054	0	0	0	0
1	18	4	8	1	26	27	1.176	1.180	57	58	1.233	1.238	5	1.238	1.026	212
2	78	5	11	2	98	212	1.245	1.316	194	308	1.439	1.624	185	2.862	2.052	810
3	94	7	13	4	265	430	1.297	1.455	383	548	1.680	2.003	323	4.865	3.078	1.787
4	82	5	24	8	626	736	1.237	1.296	745	855	1.982	2.151	169	7.016	4.104	2.912
5	63	7	16	5	145	265	1.098	1.104	236	356	1.334	1.460	126	8.476	5.130	3.346
6	54	4	18	2	277	281	1.265	1.373	355	359	1.620	1.732	112	10.208	6.156	4.052
7	41	1	9	2	98	89	1.167	1.156	151	142	1.318	1.298	-20	11.506	7.182	4.324
8	26	0	5	1	165	158	1.035	1.009	197	190	1.232	1.199	-33	12.705	8.208	4.497
9	11	0	3	0	45	44	1.050	1.067	59	58	1.109	1.125	16	13.830	9.234	4.596

Tabelle 76 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 03 in Testreihe 5 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.
0	41	4	4	0	3	3	4	4	52	52	56	56	0
30	45	4	5	0	3	3	5	5	56	56	60	61	0
60	60	5	6	0	8	8	7	7	78	78	85	85	1
90	83	7	6	0	8	9	11	12	104	104	115	116	2
120	90	5	8	1	7	8	12	14	110	112	122	126	4
150	61	5	6	1	6	8	9	13	79	81	89	94	6
180	53	7	6	1	5	6	10	11	72	74	82	85	3
240	47	6	5	0	4	4	8	8	62	63	70	71	1
300	43	5	5	0	6	6	6	6	58	58	65	64	-1
360	40	4	4	0	4	4	5	5	52	52	57	57	0
480	42	5	4	0	4	4	5	5	55	55	60	60	0

5 Tabelle 77 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 03 in Testreihe 5 [nmol/h]

	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
0	4	1	4	1	4	4	475	475	14	14	489	489	0	0	0	0
1	4	3	5	2	56	56	632	632	70	70	702	702	0	702	486	216
2	5	4	8	4	105	111	782	846	126	132	908	978	70	1.680	972	708
3	21	2	12	3	106	118	1.116	1.283	144	156	1.260	1.439	179	3.119	1.458	1.661
4	27	5	9	2	75	79	1.052	1.161	118	122	1.170	1.283	113	4.402	1.944	2.458
5	24	3	14	4	61	63	1.038	1.038	106	108	1.144	1.146	2	5.548	2.430	3.118
6	17	4	10	2	54	54	992	992	87	87	1.079	1.079	0	6.627	2.916	3.711
7	12	2	7	1	28	28	699	699	50	50	749	749	0	7.376	3.402	3.974
8	5	1	5	1	12	12	513	513	24	24	537	537	0	7.913	3.888	4.025
9	3	2	4	0	6	6	456	456	15	15	471	471	0	8.384	4.374	4.010

Tabelle 78 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 04 in Testreihe 5 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	B6+PA> frei	B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.
0	41	4	4	0	3	3	4	4	52	52	56	56	0
30	45	4	5	0	3	3	5	5	56	56	60	61	0
60	60	5	6	0	8	8	7	7	78	78	85	85	1
90	83	7	6	0	8	9	11	12	104	104	115	116	2
120	90	5	8	1	7	8	12	14	110	112	122	126	4
150	61	5	6	1	6	8	9	13	79	81	89	94	6
180	53	7	6	1	5	6	10	11	72	74	82	85	3
240	47	6	5	0	4	4	8	8	62	63	70	71	1
300	43	5	5	0	6	6	6	6	58	58	65	64	-1
360	40	4	4	0	4	4	5	5	52	52	57	57	0
480	42	5	4	0	4	4	5	5	55	55	60	60	0

Tabelle 79 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 04 in Testreihe 5 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto- Exkretion	Basis- Exkretion	Netto- Exkretion
0	6	2	2	3	7	7	533	533	20	20	553	553	0	0	0	0
1	16	3	6	1	21	21	870	870	47	47	917	917	0	917	558	359
2	37	4	7	2	105	108	933	967	155	158	1.088	1.125	37	2.042	1.116	926
3	58	6	10	3	63	64	974	1.086	140	141	1.114	1.227	113	3.269	1.674	1.595
4	79	7	8	4	52	53	762	772	150	151	912	923	11	4.192	2.232	1.960
5	76	7	6	3	55	128	731	743	147	220	878	963	85	5.155	2.790	2.365
6	54	6	9	2	58	92	916	1.012	129	163	1.045	1.175	130	6.330	3.348	2.982
7	43	5	4	2	42	74	854	888	96	128	950	1.016	66	7.346	3.906	3.440
8	22	4	3	3	33	33	609	612	65	65	674	677	3	8.023	4.464	3.559
9	10	2	3	2	12	12	544	545	29	29	573	574	1	8.597	5.022	3.575

5 Tabelle 80 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 05 in Testreihe 5 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.
0	34	2	3	0	3	3	4	6	43	43	47	49	2
30	43	5	6	0	6	6	5	7	61	60	66	67	2
60	62	7	8	0	7	7	7	9	84	84	91	93	3
90	78	7	10	0	8	9	10	10	102	103	112	113	0
120	65	7	7	0	7	9	10	12	86	88	96	100	5
150	83	8	6	0	6	9	9	9	103	106	112	115	4
180	64	6	5	0	5	6	7	7	81	83	88	90	2
240	59	6	6	0	4	6	6	6	75	77	81	83	2
300	40	5	5	1	3	4	6	6	54	55	60	61	1
360	33	3	4	0	3	3	5	5	43	43	48	48	0

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	Vitamin frei <Vitamin B6+PA>	Vitamin total <Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
480	36	3	5	0	4	5	5	5	48	49	53	54	1

Tabelle 81 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 05 in Testreihe 5 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	Vitamin frei <Vitamin B6+PA>	Vitamin total <Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.	Brutto- Exkretion	Basis- Exkretion	Netto- Exkretion
0	7	0	0	0	8	8	415	415	15	15	430	430	0	0	0	0
1	24	0	2	1	61	61	572	572	88	88	660	660	0	660	436	224
2	55	1	5	3	115	128	648	797	179	192	827	989	162	1.649	872	777
3	67	0	8	5	184	206	893	1.006	264	286	1.157	1.292	135	2.941	1.308	1.633
4	64	1	9	4	145	145	828	847	223	223	1.051	1.070	19	4.011	1.744	2.267
5	50	2	7	6	109	109	759	759	174	174	933	933	0	4.944	2.180	2.764
6	58	1	4	3	162	177	883	883	228	243	1.111	1.126	15	6.070	2.616	3.454
7	46	1	2	2	85	85	745	745	136	136	881	881	0	6.951	3.052	3.899
8	33	1	3	1	13	13	773	773	51	51	824	824	0	7.775	3.488	4.287
9	19	0	2	0	7	7	466	486	28	28	494	514	20	8.289	3.924	4.365

Tabelle 82 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 06 in Testreihe 5 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	Vitamin frei <Vitamin B6+PA>	Vitamin total <Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
0	43	5	4	0	4	4	6	6	55	55	61	61	0
30	47	6	7	0	5	5	7	7	63	63	70	70	0
60	68	5	7	0	6	7	9	9	86	87	95	96	1
90	82	9	9	0	5	8	9	10	105	109	114	119	5
120	89	8	9	0	5	9	11	11	110	114	122	125	4
150	73	9	8	0	6	6	19	20	96	96	114	116	2
180	66	11	7	0	5	5	16	16	89	89	105	105	0
240	58	7	3	0	6	6	11	11	75	75	85	86	0
300	50	6	5	0	5	5	8	8	65	65	72	73	1
360	45	6	3	0	4	4	8	8	57	58	65	66	1
480	42	5	4	0	5	5	7	7	56	56	63	63	0

5

Tabelle 83 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 06 in Testreihe 5 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	Vitamin frei <Vitamin B6+PA>	Vitamin total <Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.	Brutto- Exkretion	Basis- Exkretion	Netto- Exkretion
0	4	0	2	0	4	4	373	373	10	10	383	383	0	0	0	0
1	16	4	5	1	11	11	785	785	37	37	822	822	0	822	374	448
2	28	6	9	2	39	41	988	990	84	86	1.072	1.076	4	1.898	748	1.150

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
3	34	8	7	2	58	64	974	1.142	109	115	1.083	1.257	174	3.155	1.122	2.033
4	5	10	4	3	69	73	1.048	1.084	91	95	1.139	1.179	40	4.334	1.496	2.838
5	2	7	2	2	94	98	712	727	107	111	819	838	19	5.172	1.870	3.302
6	0	6	3	2	75	76	564	568	86	87	650	655	5	5.827	2.244	3.583
7	0	4	1	3	52	52	482	482	60	60	542	542	0	6.369	2.618	3.751
8	5	3	0	2	22	22	403	403	32	32	435	435	0	6.804	2.992	3.812
9	6	2	1	1	7	7	368	368	17	17	385	385	0	7.189	3.366	3.823

Tabelle 84 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 07 in Testreihe 5 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.
0	26	3	5	0	1	1	6	6	34	34	41	41	0
30	37	7	5	0	1	1	9	9	49	49	58	58	0
60	45	11	9	0	2	2	14	15	66	66	80	81	1
90	50	10	8	1	1	1	9	10	70	70	78	80	2
120	52	7	8	1	2	3	10	10	71	71	81	81	0
150	63	7	8	0	3	3	8	9	80	81	88	90	2
180	81	9	7	0	3	4	11	11	99	100	111	111	1
240	60	8	7	0	2	3	7	7	77	77	83	84	1
300	43	6	6	0	2	2	5	5	56	57	61	62	0
360	34	4	5	0	1	1	6	6	45	45	51	51	0
480	29	5	5	0	1	2	7	7	40	41	47	48	1

Tabelle 85 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 07 in Testreihe 5 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
0	6	0	2	1	4	4	446	446	13	13	459	459	0	0	0	0
1	4	0	2	4	17	22	588	603	27	32	615	635	20	635	443	192
2	6	1	3	2	52	63	793	851	64	75	857	926	69	1.561	886	675
3	18	0	5	4	61	78	899	1.083	88	105	987	1.188	201	2.749	1.329	1.420
4	51	1	4	3	79	106	782	956	138	165	920	1.121	201	3.870	1.772	2.098
5	46	2	6	7	87	104	794	847	148	165	942	1.012	70	4.882	2.215	2.667
6	34	1	5	4	73	82	728	736	117	126	845	862	17	5.744	2.658	3.086
7	22	1	7	2	65	69	660	662	97	101	757	763	6	6.507	3.101	3.406
8	14	0	5	1	40	43	618	619	60	63	678	682	4	7.189	3.544	3.645
9	7	0	1	2	11	11	528	528	21	21	549	549	0	7.738	3.987	3.751

Tabelle 86 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 08 in Testreihe 5 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<vitamin B6+PA>	<vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
0	32	4	4	0	2	2	5	5	42	42	48	48	0
30	29	5	5	0	2	2	6	6	40	40	45	45	0
60	41	9	5	0	2	2	6	7	57	57	63	64	1
90	68	9	6	0	1	2	7	8	84	85	91	93	2
120	72	10	7	0	1	3	7	7	90	92	98	99	1
150	64	9	6	0	3	4	7	8	82	83	89	91	1
180	55	5	5	0	5	5	6	7	69	70	75	77	2
240	49	6	6	0	4	4	6	6	64	64	70	70	0
300	38	7	5	0	3	3	6	6	52	53	58	58	0
360	33	5	4	0	3	3	5	5	45	45	50	50	0
480	34	5	4	0	4	2	4	4	47	45	51	49	-2

Tabelle 87 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 08 in Testreihe 5 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<vitamin B6+PA>	<vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.	Brutto- Exkretion	Basis- Exkretion	Netto- Exkretion
0	6	1	3	1	4	4	424	424	15	15	439	439	0	0	0	0
1	37	1	6	3	26	26	638	641	73	73	711	714	3	714	457	257
2	43	4	8	5	169	238	624	622	229	298	853	920	67	1.634	914	720
3	38	6	14	7	120	146	743	769	185	211	928	980	52	2.614	1.371	1.243
4	32	4	12	8	93	94	917	940	149	150	1.066	1.090	24	3.704	1.828	1.876
5	29	2	11	9	83	83	1.163	1.182	134	134	1.297	1.316	19	5.020	2.285	2.735
6	17	2	8	6	57	57	1.332	1.336	90	90	1.422	1.426	4	6.446	2.742	3.704
7	23	2	5	5	40	40	795	794	75	75	870	869	-1	7.315	3.199	4.116
8	18	1	4	4	19	19	555	557	46	46	601	603	2	7.918	3.656	4.262
9	12	2	2	4	11	11	456	456	31	31	487	487	0	8.405	4.113	4.292

5 Tabelle 88 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 09 in Testreihe 5 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<vitamin B6+PA>	<vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
0	48	4	4	0	5	5	5	5	60	60	65	65	0
30	56	12	4	0	4	4	6	6	76	76	82	82	0
60	63	11	5	0	6	7	8	10	84	84	92	94	3
90	74	11	9	0	9	13	13	14	103	107	116	121	5
120	81	10	5	1	14	14	16	17	111	111	126	128	1
150	100	9	5	1	10	10	14	16	125	125	140	141	2
180	79	8	7	1	10	10	9	9	103	103	112	112	0
240	62	7	5	0	7	8	5	5	81	81	85	86	1

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.
300	55	6	5	0	8	8	4	4	73	73	77	77	0
360	46	5	4	0	7	7	5	5	62	62	67	67	0
480	49	5	5	0	6	6	4	4	65	65	69	69	0

Tabelle 89 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 09 in Testreihe 5 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto- Exkretion	Basis- Exkretion	Netto- Exkretion
0	16	3	5	1	10	10	921	921	35	35	956	956	0	0	0	0
1	34	3	11	2	44	44	1.094	1.144	94	94	1.188	1.238	50	1.238	933	305
2	62	5	16	4	63	63	1.203	1.348	150	150	1.353	1.498	145	2.736	1.866	870
3	58	6	14	5	118	128	1.633	1.742	201	211	1.834	1.953	119	4.689	2.799	1.890
4	79	8	12	4	87	112	1.597	1.705	190	215	1.787	1.920	133	6.609	3.732	2.877
5	98	2	13	2	85	93	1.361	1.438	200	208	1.561	1.646	85	8.255	4.665	3.590
6	43	0	9	2	77	84	1.254	1.264	131	138	1.385	1.402	17	9.657	5.598	4.059
7	62	0	7	1	72	78	1.078	1.080	142	148	1.220	1.228	8	10.885	6.531	4.354
8	37	1	8	0	43	52	980	974	89	98	1.069	1.072	3	11.957	7.464	4.493
9	19	0	6	0	20	21	948	948	45	46	993	994	1	12.951	8.397	4.554

Tabelle 90 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 10 in Testreihe 5 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.
0	34	4	2	0	2	2	5	5	42	42	47	47	0
30	36	3	3	0	4	4	6	6	45	45	51	51	0
60	44	9	5	0	7	6	7	7	64	64	71	71	0
90	67	10	7	1	4	12	10	13	89	97	99	110	12
120	82	14	8	1	7	10	11	11	112	116	123	127	4
150	70	8	8	2	6	12	16	17	94	100	110	117	7
180	60	6	6	2	8	9	15	15	83	83	97	98	1
240	49	4	6	2	8	8	13	13	68	69	81	81	0
300	39	4	5	2	6	7	11	11	56	56	66	66	0
360	33	4	3	0	6	6	7	7	46	46	53	54	0
480	30	5	3	0	5	4	4	4	43	42	47	46	-1

5

Tabelle 91 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 10 in Testreihe 5 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto- Exkretion	Basis- Exkretion	Netto- Exkretion
0	8	0	3	0	9	10	633	632	20	21	653	653	0	0	0	0

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
1	44	1	5	0	21	24	885	885	71	74	956	959	3	959	645	314
2	65	2	8	1	83	113	1.191	1.222	159	189	1.350	1.411	61	2.370	1.290	1.080
3	78	4	4	4	204	262	1.334	1.403	294	352	1.628	1.755	127	4.125	1.935	2.190
4	82	2	3	4	167	208	627	819	258	299	885	1.118	233	5.243	2.580	2.663
5	63	2	2	2	121	142	954	1.032	190	211	1.144	1.243	99	6.486	3.225	3.261
6	59	3	4	1	87	94	831	844	154	161	985	1.005	20	7.491	3.870	3.621
7	46	1	3	0	61	63	790	793	111	113	901	906	5	8.397	4.515	3.882
8	21	0	5	1	27	28	704	704	54	55	758	759	1	9.156	5.160	3.996
9	14	0	4	0	14	14	650	650	32	32	682	682	0	9.838	5.805	4.033

Tabelle 92 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 11 in Testreihe 5 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.
0	31	4	2	0	4	4	4	4	40	40	45	45	0
30	32	3	2	0	5	5	4	4	43	42	47	46	0
60	43	4	2	0	6	10	5	7	55	59	60	66	6
90	55	6	3	1	6	7	7	9	71	72	78	81	3
120	87	11	3	1	7	7	10	11	109	109	119	120	1
150	79	9	4	1	6	6	10	10	98	98	108	108	1
180	63	7	3	0	5	5	9	9	79	79	87	87	0
240	55	6	3	0	4	5	7	7	68	68	74	75	0
300	43	7	4	0	4	4	6	6	57	57	63	63	0
360	29	4	3	0	4	4	5	5	40	40	44	44	0
480	30	5	3	0	5	5	4	4	43	43	47	47	0

Tabelle 93 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 11 in Testreihe 5 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto-Exkretion	Basis-Exkretion	Netto-Exkretion
0	5	2	3	1	4	4	609	609	15	15	624	624	0	0	0	0
1	18	1	6	0	47	47	683	683	72	72	755	755	0	755	618	137
2	63	0	14	0	98	102	776	776	175	179	951	955	4	1.710	1.236	474
3	99	1	16	1	217	236	1.045	1.148	334	353	1.379	1.501	122	3.211	1.854	1.357
4	58	2	12	0	136	148	1.004	1.122	208	220	1.212	1.342	130	4.553	2.472	2.081
5	34	6	8	1	164	173	937	961	213	222	1.150	1.183	33	5.736	3.090	2.646
6	20	5	6	1	92	96	762	762	124	128	886	890	4	6.626	3.708	2.918
7	9	5	7	0	66	66	654	654	87	87	741	741	0	7.367	4.326	3.041
8	7	4	5	0	34	35	637	637	50	51	687	688	1	8.055	4.944	3.111
9	4	4	5	0	12	12	626	626	25	25	651	651	0	8.706	5.562	3.144

Tabelle 94 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 12 in Testreihe 5 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA>	<Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
0	43	5	4	0	4	4	6	6	55	55	61	61	0
30	47	6	7	0	5	5	7	7	63	63	70	70	0
60	68	5	7	0	6	7	9	9	86	87	95	96	1
90	82	9	9	0	5	8	9	10	105	109	114	119	5
120	89	8	9	0	5	9	11	12	110	114	122	126	5
150	73	9	8	0	6	6	19	21	96	96	114	117	3
180	66	11	7	0	5	5	16	16	89	89	105	105	0
240	58	7	3	0	6	6	11	11	75	75	85	86	0
300	50	6	5	0	5	5	8	8	65	65	72	73	1
360	45	6	3	0	4	4	8	8	57	58	65	66	1
480	42	5	4	0	5	5	7	7	56	56	63	63	0

Tabelle 95 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 12 in Testreihe 5 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA>	<Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.	Brutto- Exkretion	Basis- Exkretion	Netto- Exkretion
0	6	2	4	0	10	10	711	711	22	22	733	733	0	0	0	0
1	11	3	4	0	46	46	926	926	64	64	990	990	0	990	731	259
2	16	5	3	2	452	455	1.135	1.278	478	481	1.613	1.759	146	2.749	1.462	1.287
3	22	6	7	1	821	839	1.147	1.199	857	875	2.004	2.074	70	4.823	2.193	2.630
4	49	4	5	5	632	647	1.193	1.267	695	710	1.888	1.977	89	6.800	2.924	3.876
5	56	3	9	4	208	210	943	998	280	282	1.223	1.280	57	8.080	3.655	4.425
6	32	4	10	3	155	154	788	774	204	203	992	977	-15	9.057	4.386	4.671
7	24	2	7	4	97	98	905	920	134	135	1.039	1.055	16	10.112	5.117	4.995
8	14	1	4	2	43	43	755	756	64	64	819	820	1	10.932	5.848	5.084
9	9	1	5	1	16	16	701	701	32	32	733	733	0	11.665	6.579	5.086

5 Tabelle 96 Plasmaspiegel an B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 6 [nM]

Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA>	<Vitamin B6+PA>	Ges.-B6 gebund.
0	35	5	4	3	3	3	5	5	50	50	55	55	0
10	46	7	4	5	13	13	13	13	75	75	88	88	0
20	72	9	5	5	14	14	11	11	105	105	116	116	0
30	81	10	4	4	14	16	12	12	113	115	125	127	2
40	79	9	5	5	14	14	9	9	112	112	121	121	0
50	77	9	6	6	13	13	10	10	111	111	121	121	0
60	53	7	7	5	7	7	10	10	79	79	89	89	0
75	49	8	6	4	9	9	9	9	76	76	85	85	0
90	39	6	6	3	7	7	9	9	61	61	70	70	0
105	40	5	6	7	7	7	7	7	65	65	72	72	0

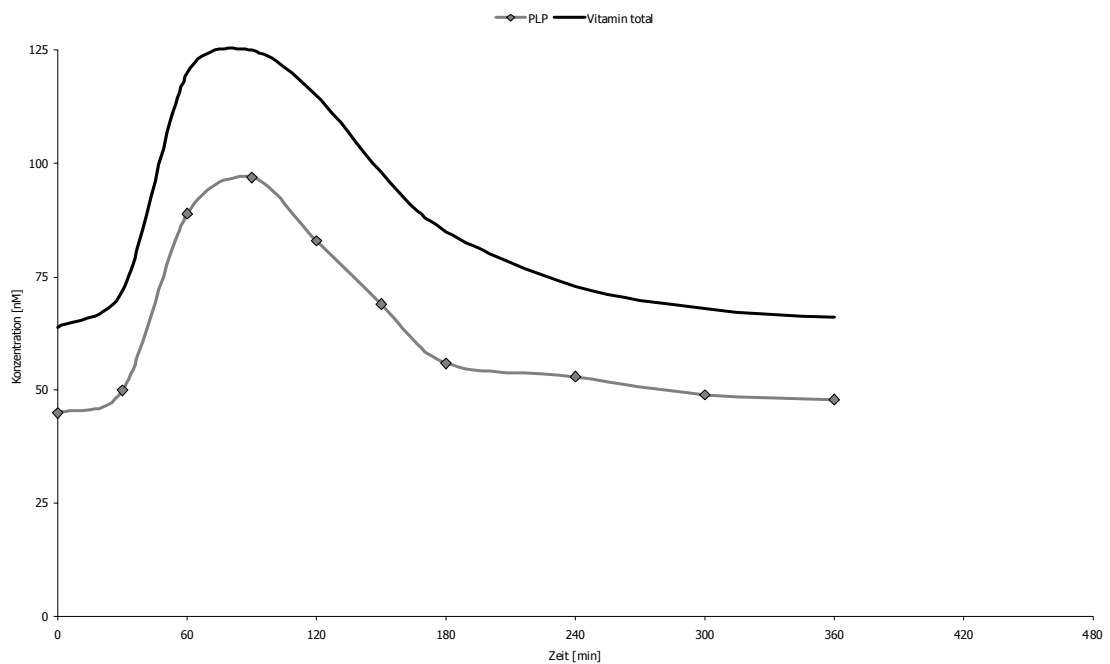
Zeit [min]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.
120	39	5	5	5	8	8	8	8	62	62	70	70	0
150	36	4	5	6	6	6	8	8	57	57	65	65	0
180	49	9	4	4	8	8	12	12	74	74	86	86	0
210	60	11	4	5	5	5	12	12	85	85	97	97	0
240	55	9	5	5	7	7	13	13	81	81	94	94	0
300	43	5	4	4	4	4	7	7	60	60	67	67	0
360	38	4	4	6	3	3	5	5	55	55	60	60	0
420	36	4	4	5	3	3	5	5	52	52	57	57	0

Tabelle 97 Exkretion von B6-Formen bei Versuchsperson 01 in Testreihe 6 [nmol/h]

Zeit [h]	PLP	PMP	PL	PM	PN_frei	PN_total	PA_frei	PA_total	Vitamin frei	Vitamin total	<Vitamin B6+PA> frei	<Vitamin B6+PA> total	Ges.-B6 gebund.	Brutto- Exkretion	Basis- Exkretion	Netto- Exkretion
0	7	0	5	0	8	8	471	471	20	20	491	491	0	0	0	0
1	10	2	5	1	374	374	1.168	1.168	392	392	1.560	1.560	0	1.560	504	1.056
2	17	4	8	2	228	228	1.552	1.552	259	259	1.811	1.811	0	3.371	1.008	2.363
3	14	6	10	4	156	156	1.777	1.777	190	190	1.967	1.967	0	5.338	1.512	3.826
4	10	5	9	3	111	111	1.282	1.282	138	138	1.420	1.420	0	6.758	2.016	4.742
5	10	5	7	2	108	108	843	843	132	132	975	975	0	7.733	2.520	5.213
6	9	4	6	2	71	71	946	946	92	92	1.038	1.038	0	8.771	3.024	5.747
7	7	5	5	1	37	37	637	637	55	55	692	692	0	9.463	3.528	5.935
8	5	3	6	1	11	11	501	501	26	26	527	527	0	9.990	4.032	5.958

7.2.1.3. grafische Darstellungen

Hier sind diejenigen Diagramme nachgetragen, die nicht im Ergebnisteil enthalten sind; Erläuterung siehe dort.



- 5 Diagramm 36 Testreihe_1: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_02; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]

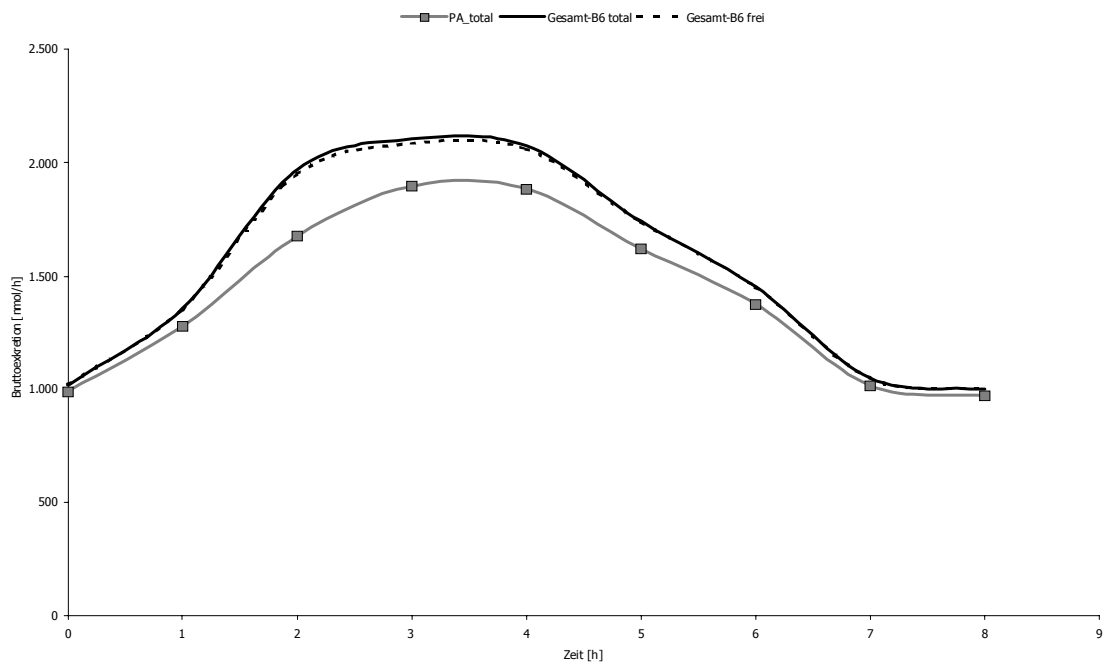


Diagramm 37 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—total, ...frei) je Stunde in Testreihe_1, Versuchsperson_02; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

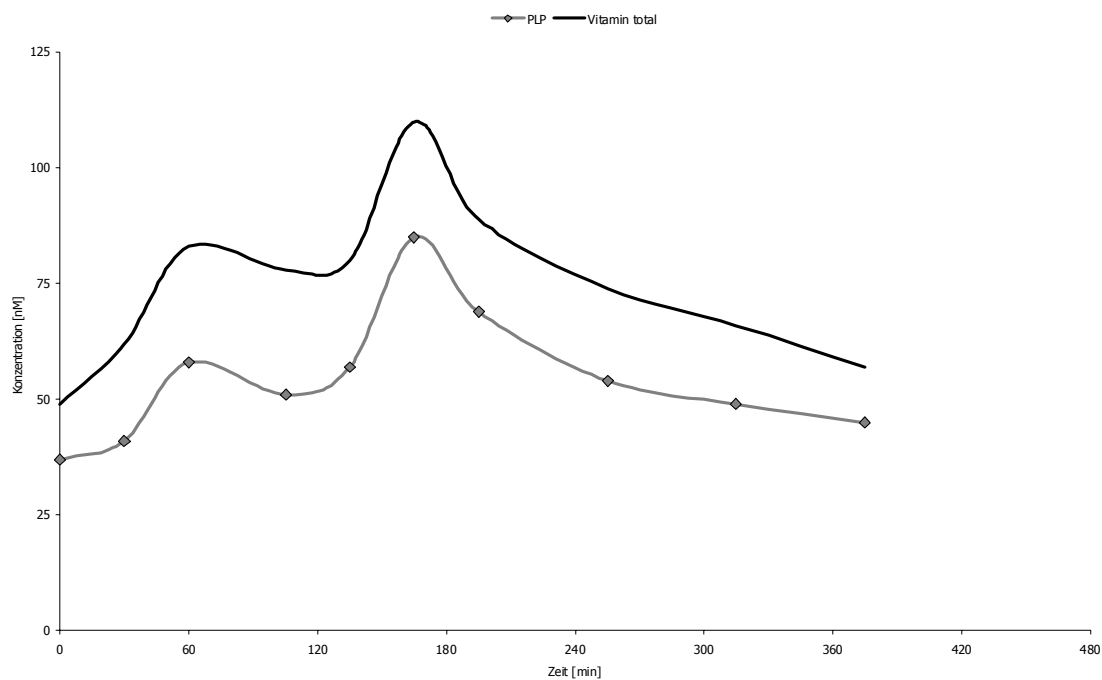
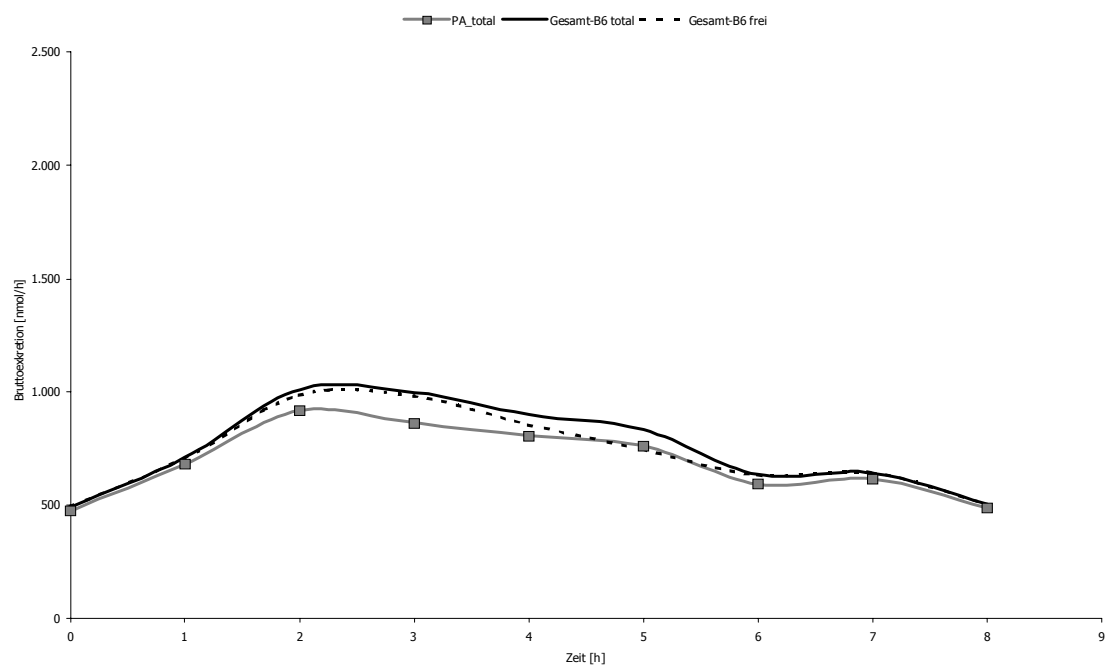


Diagramm 38 Testreihe_1: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_03; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



5 Diagramm 39 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—total, ...frei) je Stunde in Testreihe_1, Versuchsperson_03; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

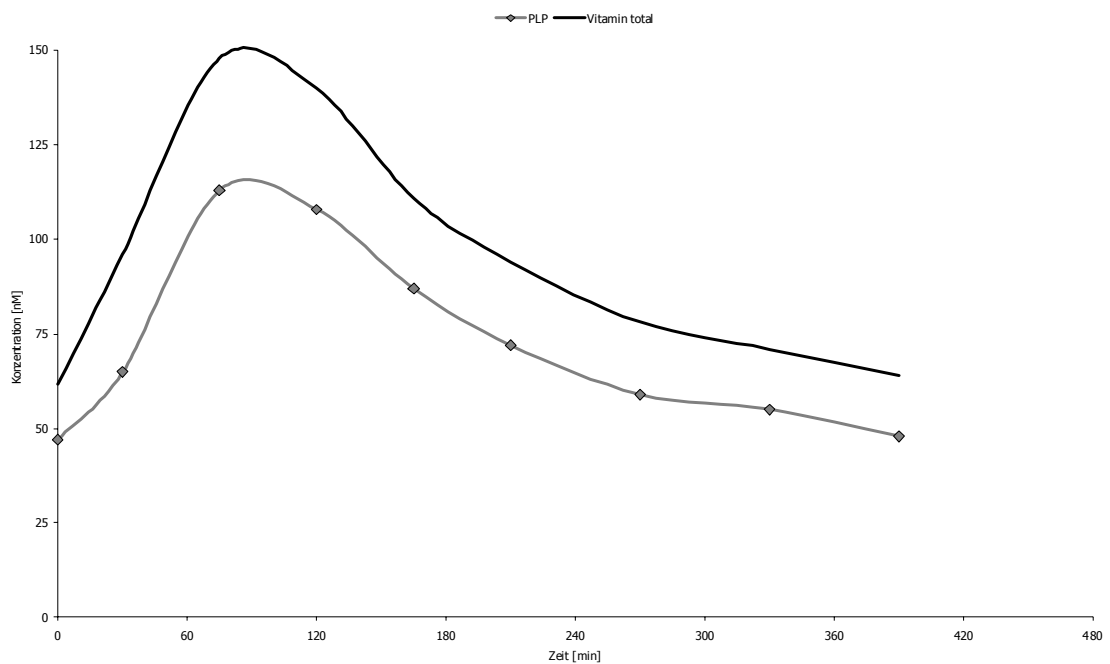
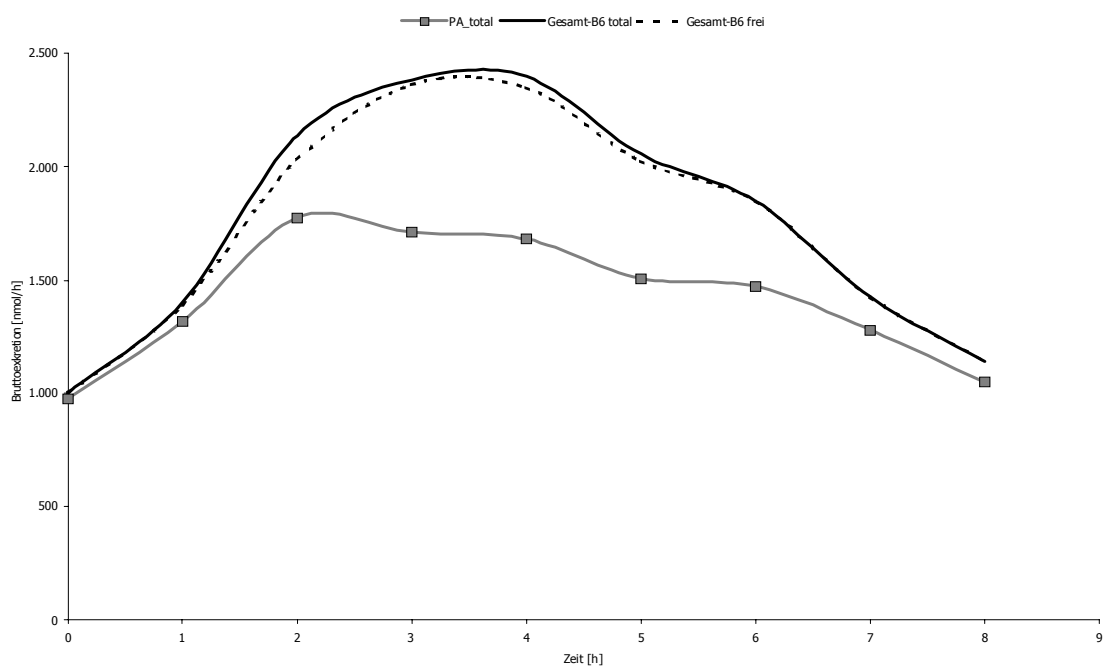


Diagramm 40 Testreihe_2: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_02; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



- 5 Diagramm 41 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—total, ...frei) je Stunde in Testreihe_2, Versuchsperson_02; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

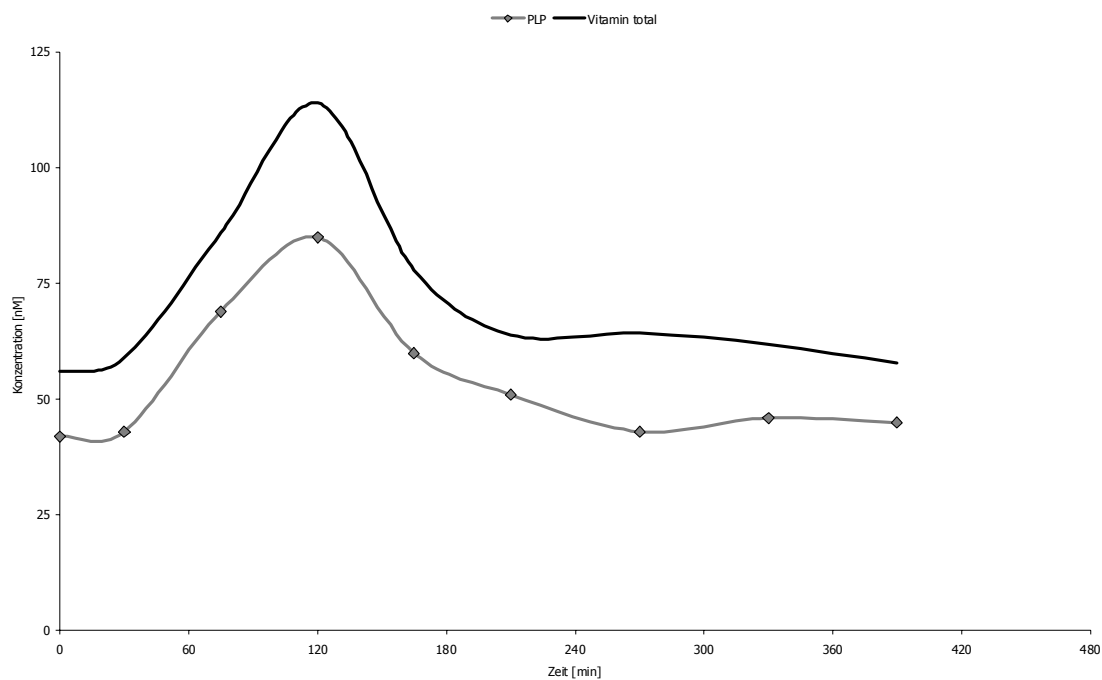
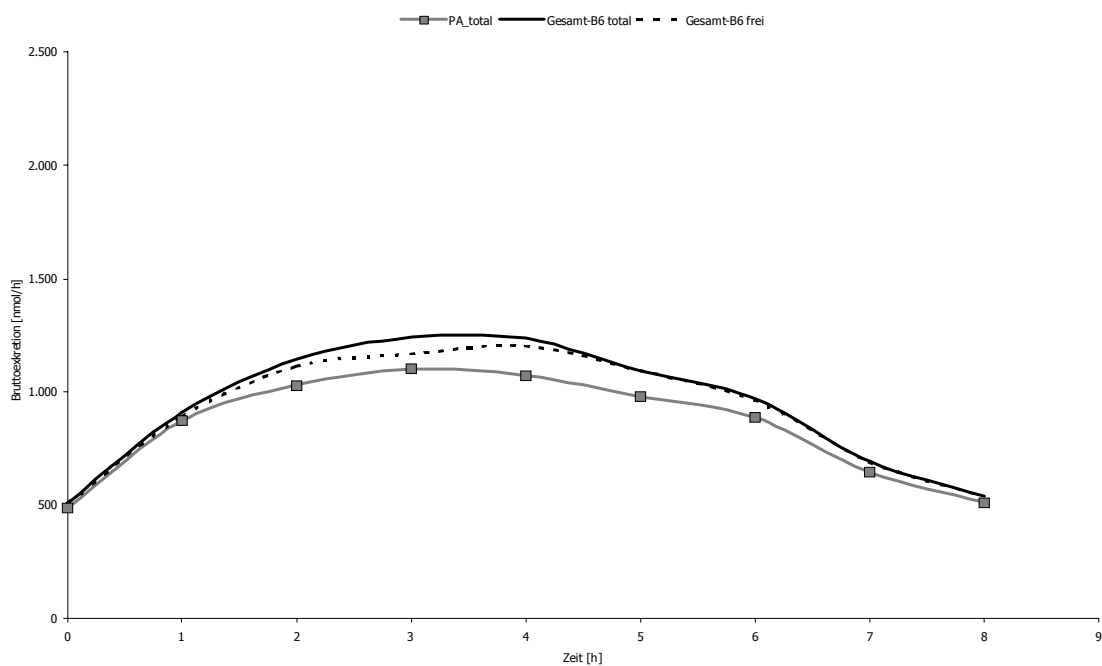


Diagramm 42 Testreihe_2: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_03; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



5 Diagramm 43 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—total, ...frei) je Stunde in Testreihe_2, Versuchsperson_03; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

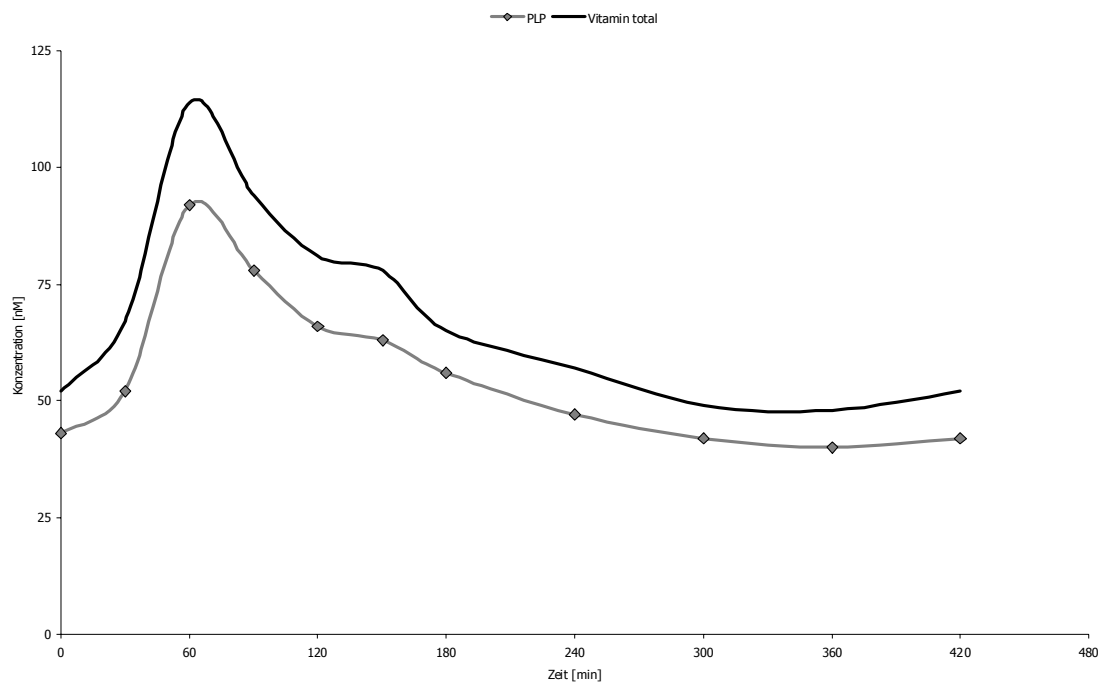
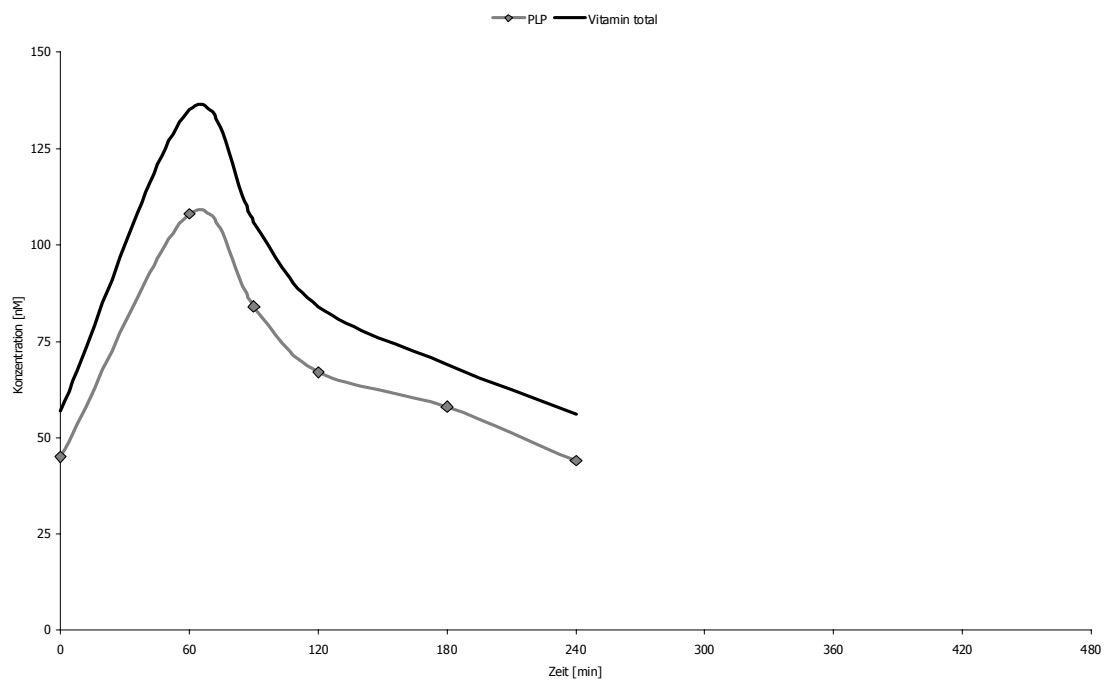


Diagramm 44 Testreihe_4: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_02; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



- 5 Diagramm 45 Testreihe_3: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_02, x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]

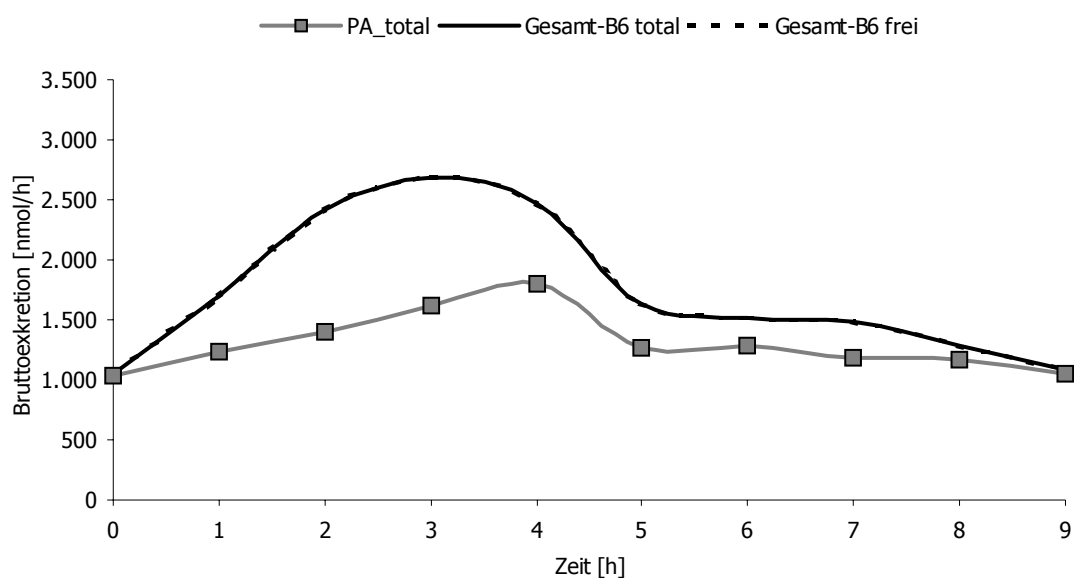
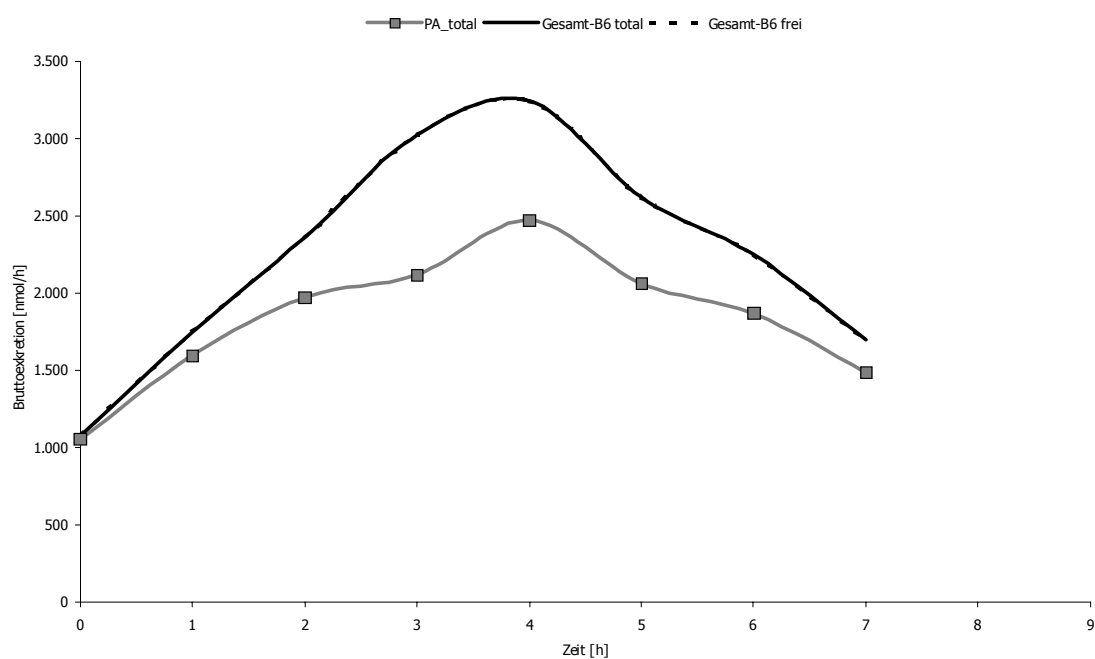


Diagramm 46 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—) je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_02; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]



5

Diagramm 47 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—) je Stunde in Testreihe_3, Versuchsperson_02, x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

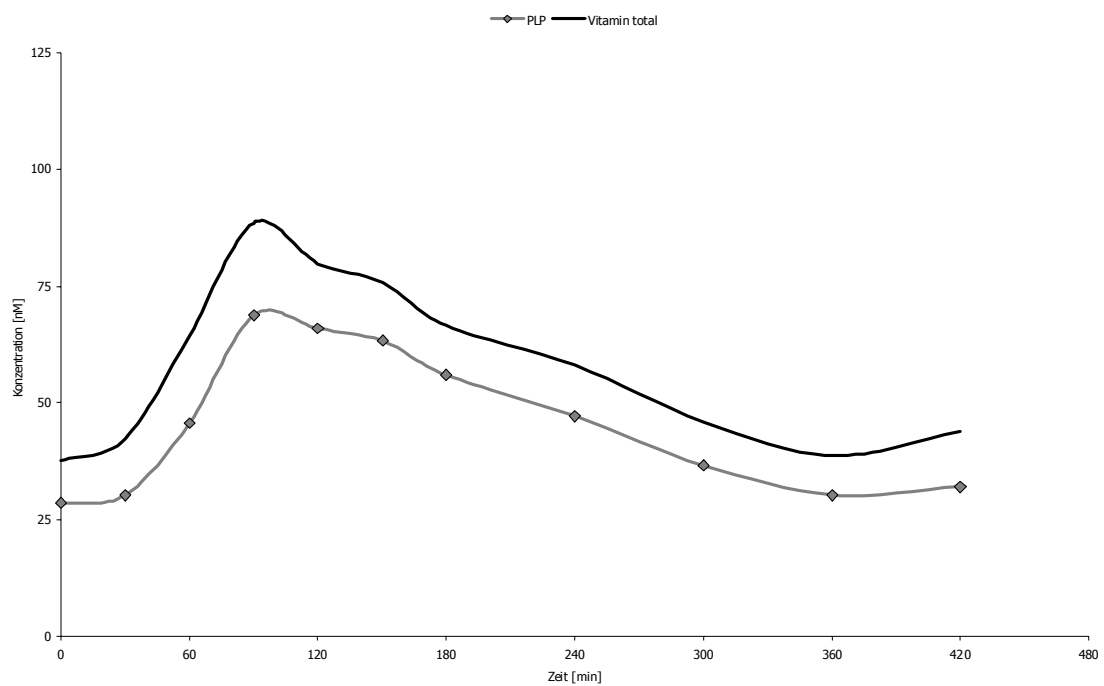
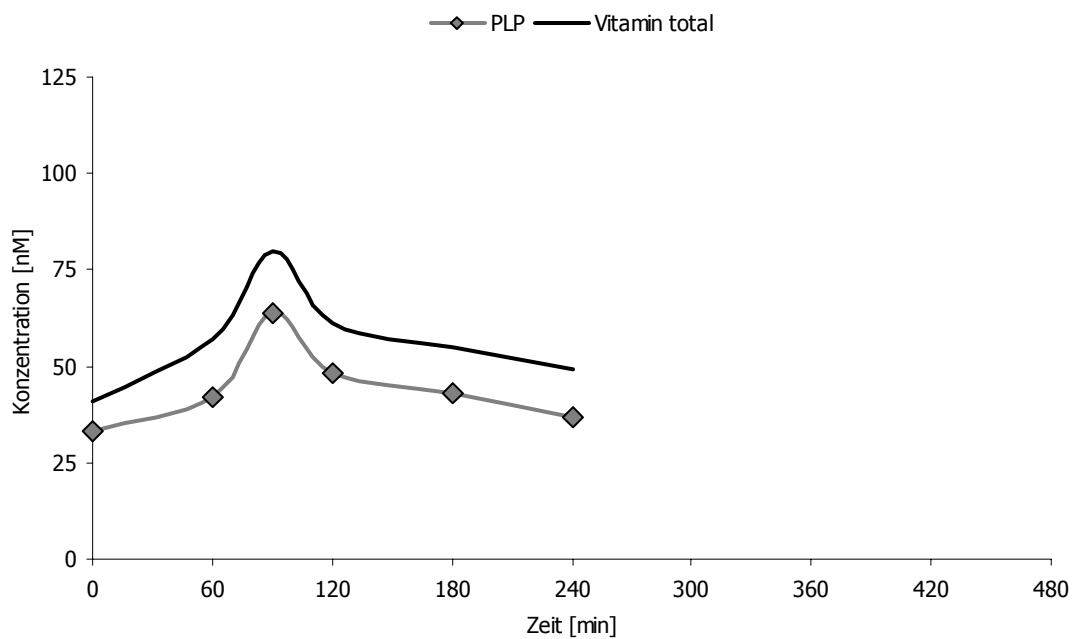


Diagramm 48 Testreihe_4: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_03; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



- 5 Diagramm 49 Testreihe_3: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_03, x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]

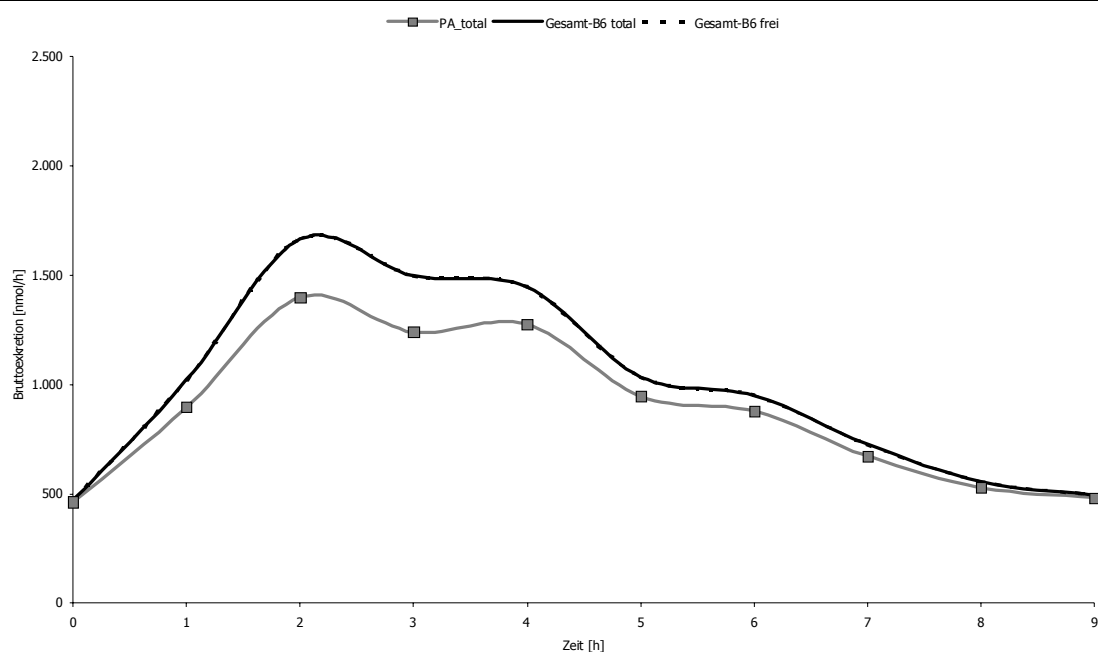
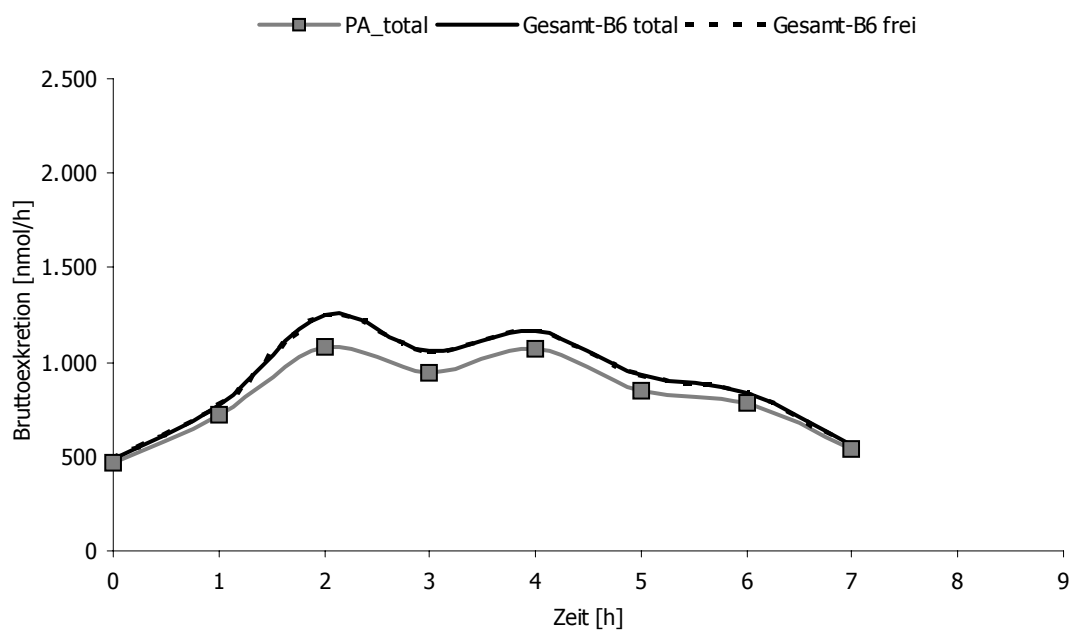


Diagramm 50 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—) je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_03; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]



- 5 Diagramm 51 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—) je Stunde in Testreihe_3, Versuchsperson_03; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

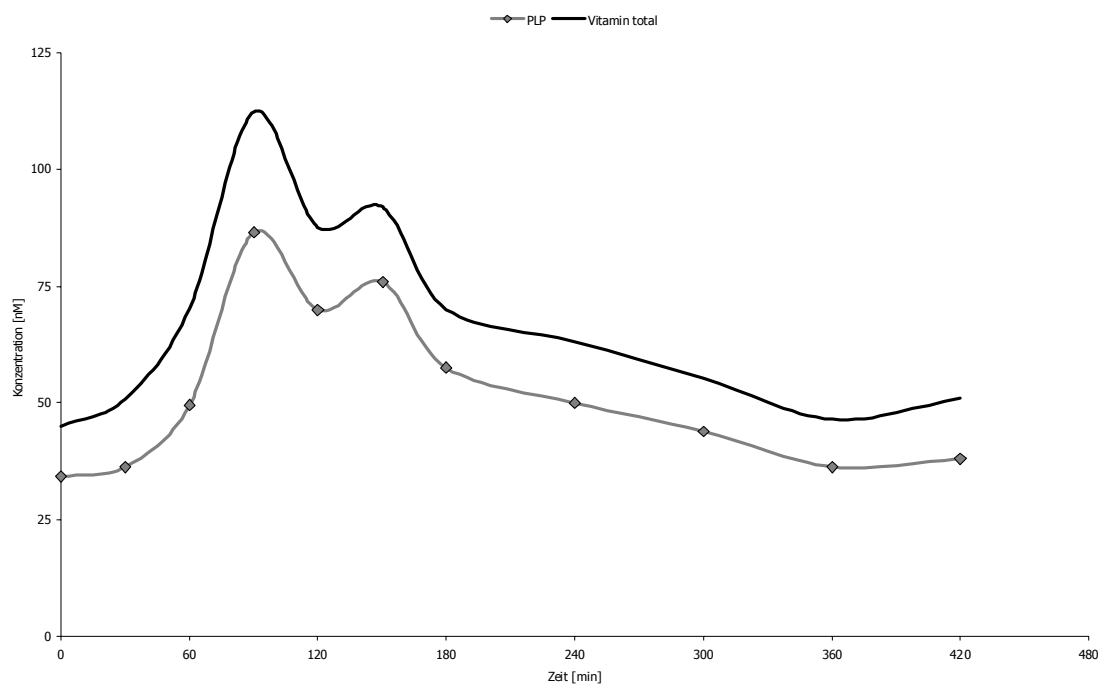
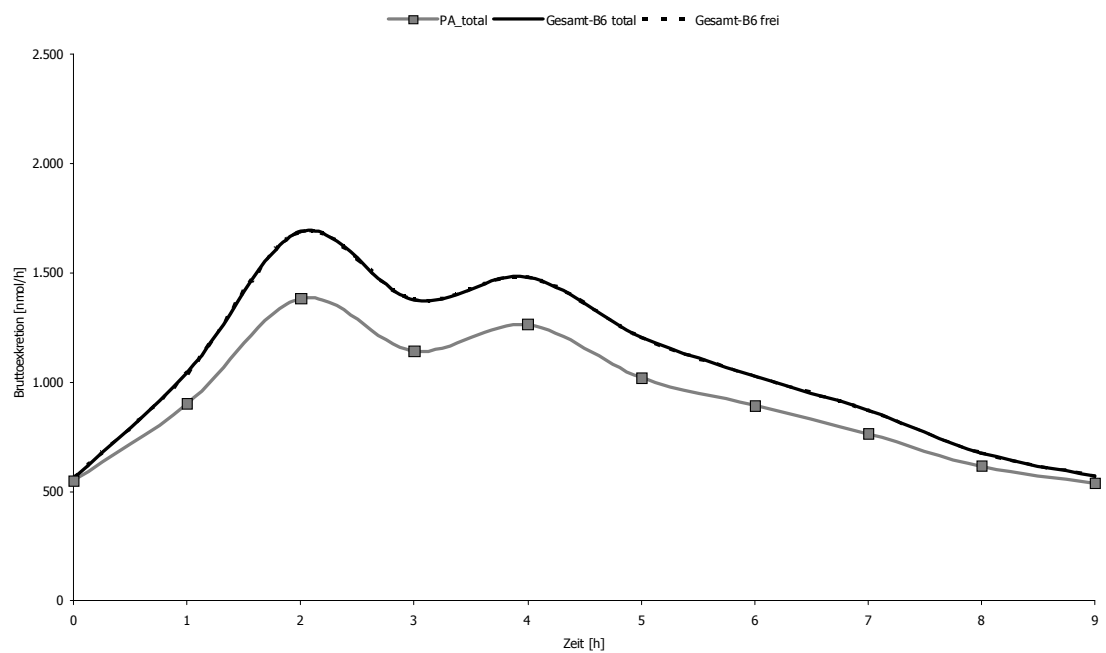


Diagramm 52 Testreihe_4: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_04; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



- 5 Diagramm 53 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—) je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_04; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

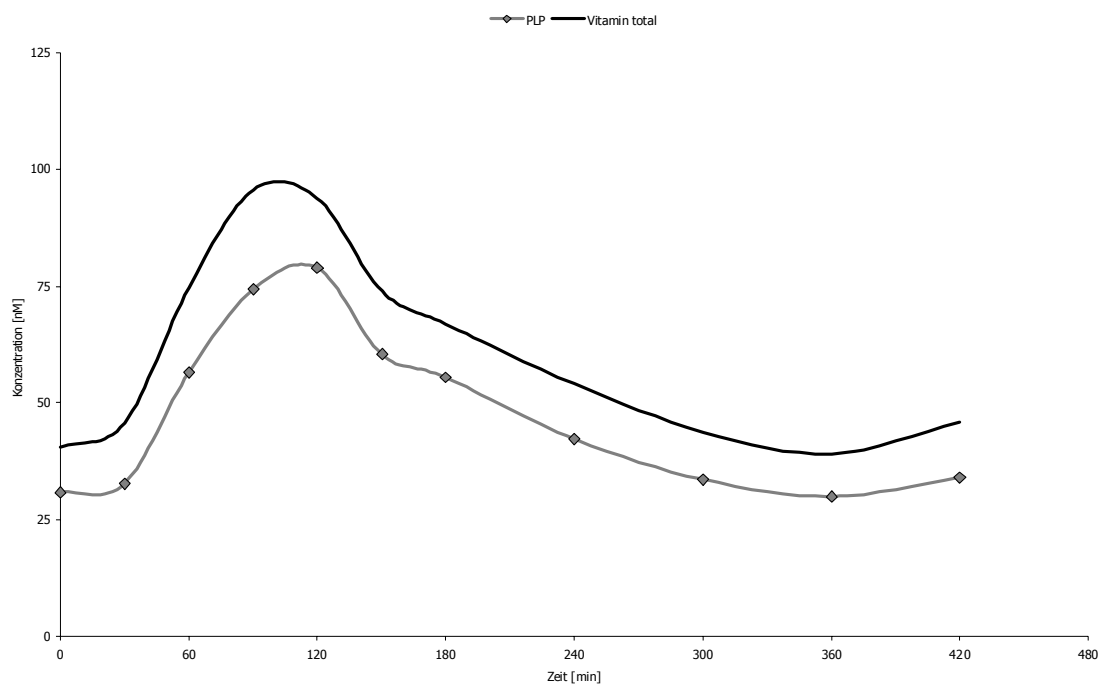
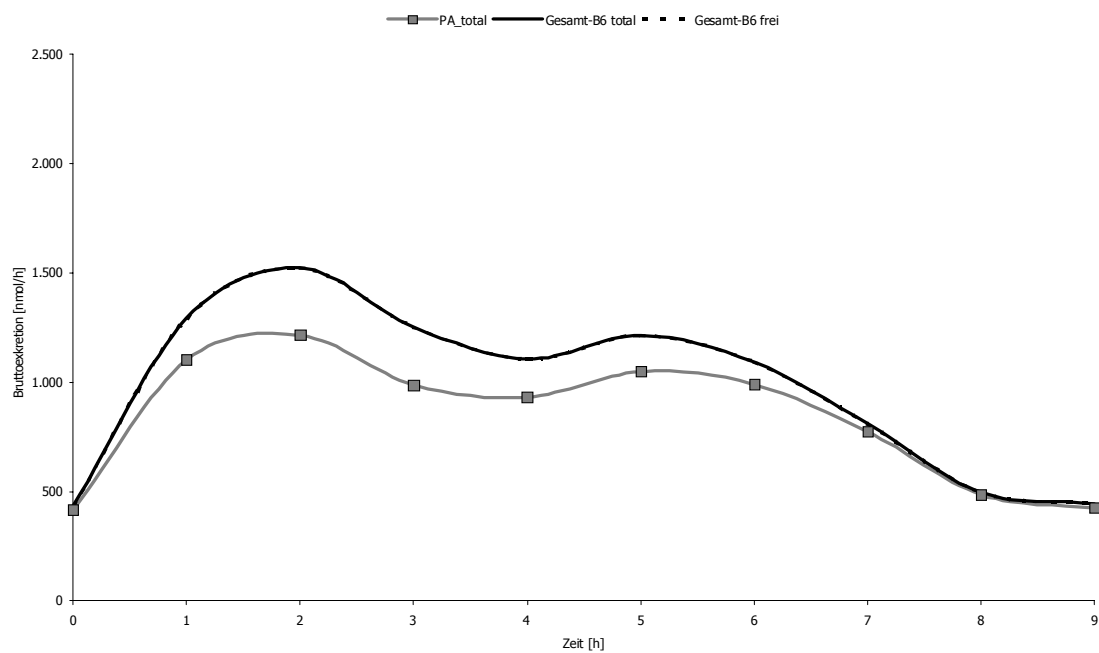


Diagramm 54 Testreihe_4: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_05; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



5 Diagramm 55 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—) je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_05; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

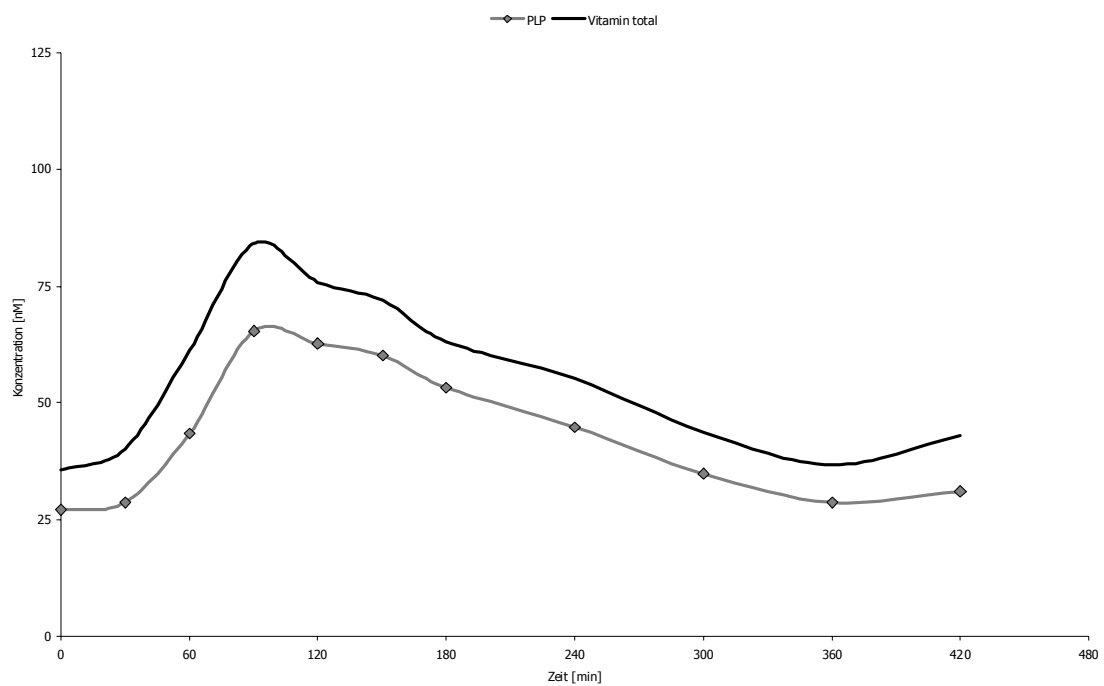
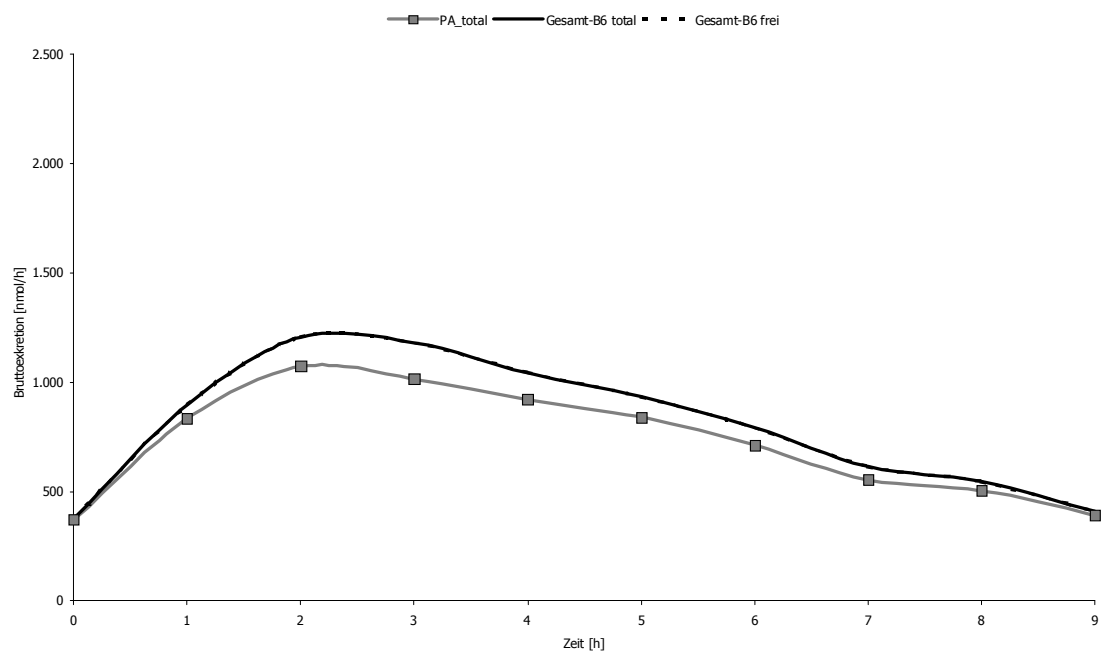


Diagramm 56 Testreihe_4: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_06; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



- 5 Diagramm 57 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—) je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_06; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

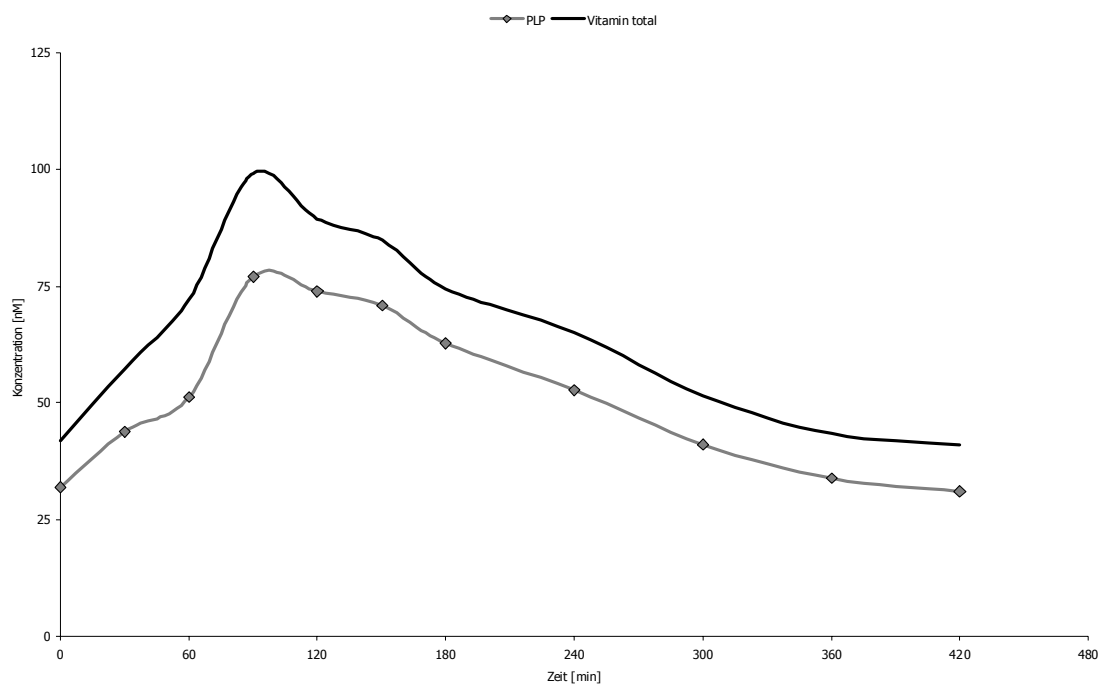
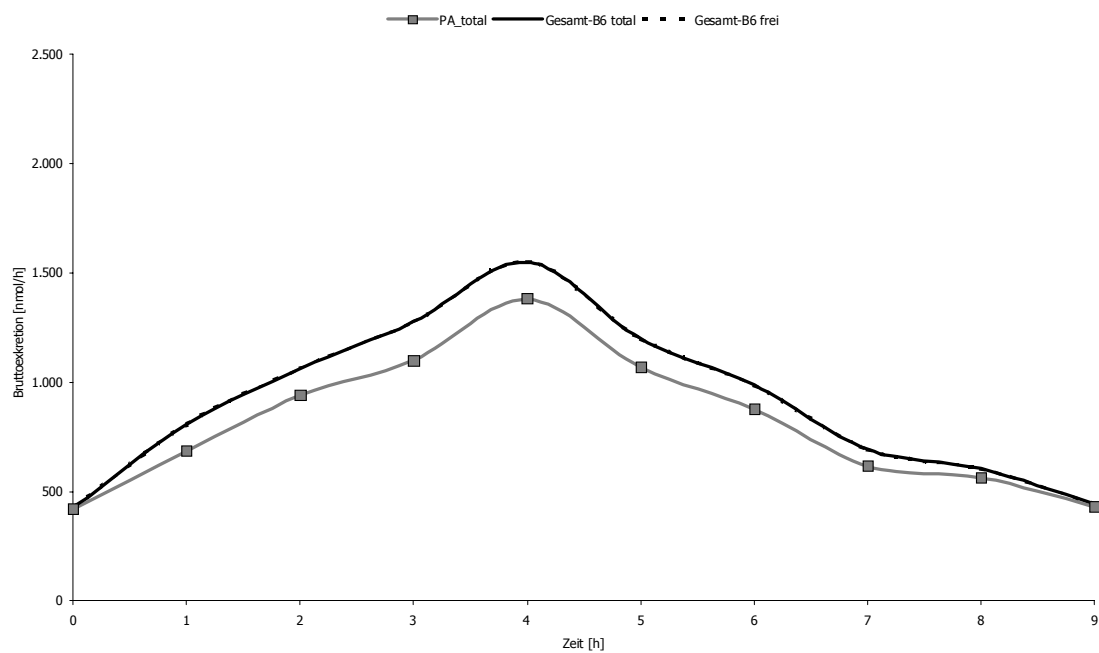


Diagramm 58 Testreihe_4: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_07; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



5 Diagramm 59 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—) je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_07; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

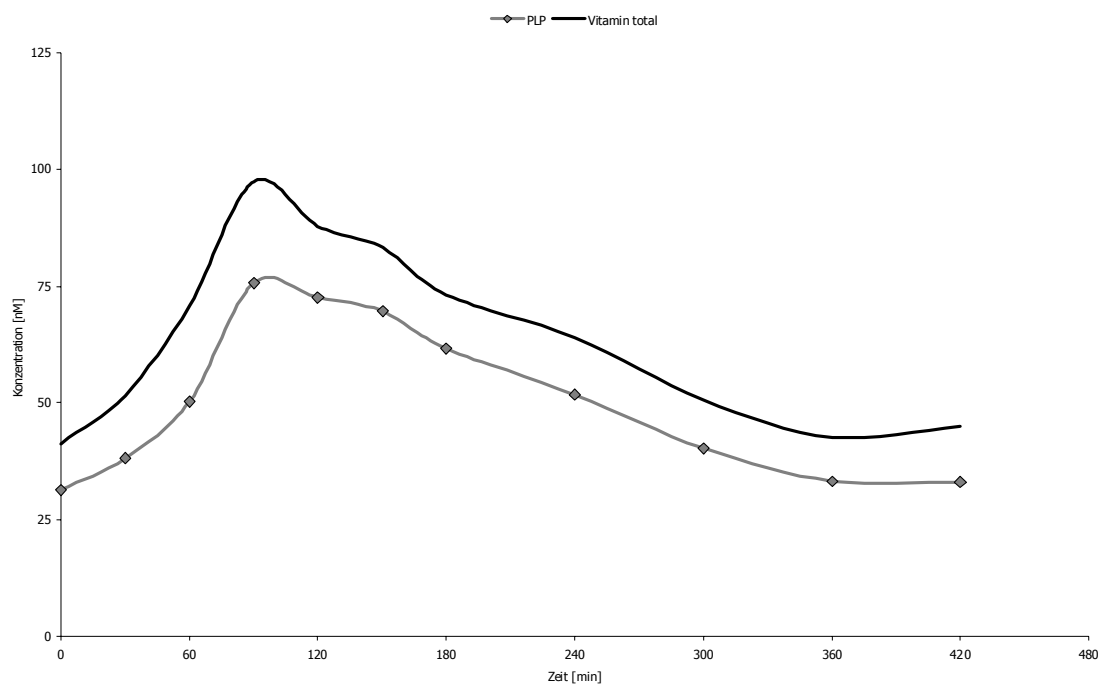
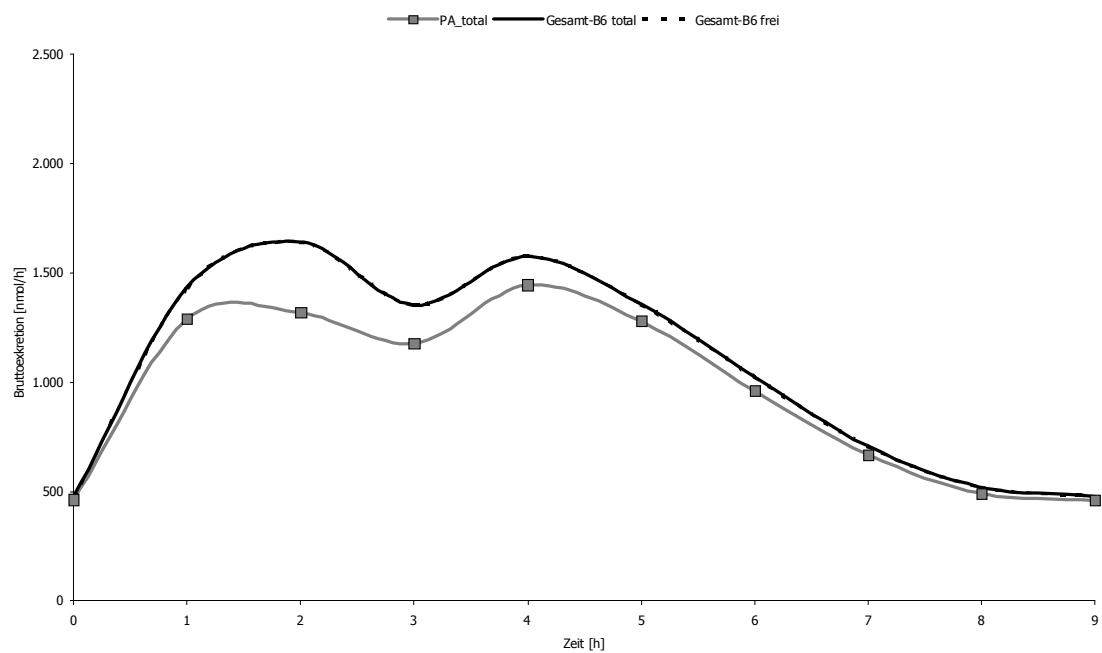


Diagramm 60 Testreihe_4: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_08; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



- 5 Diagramm 61 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—) je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_08; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

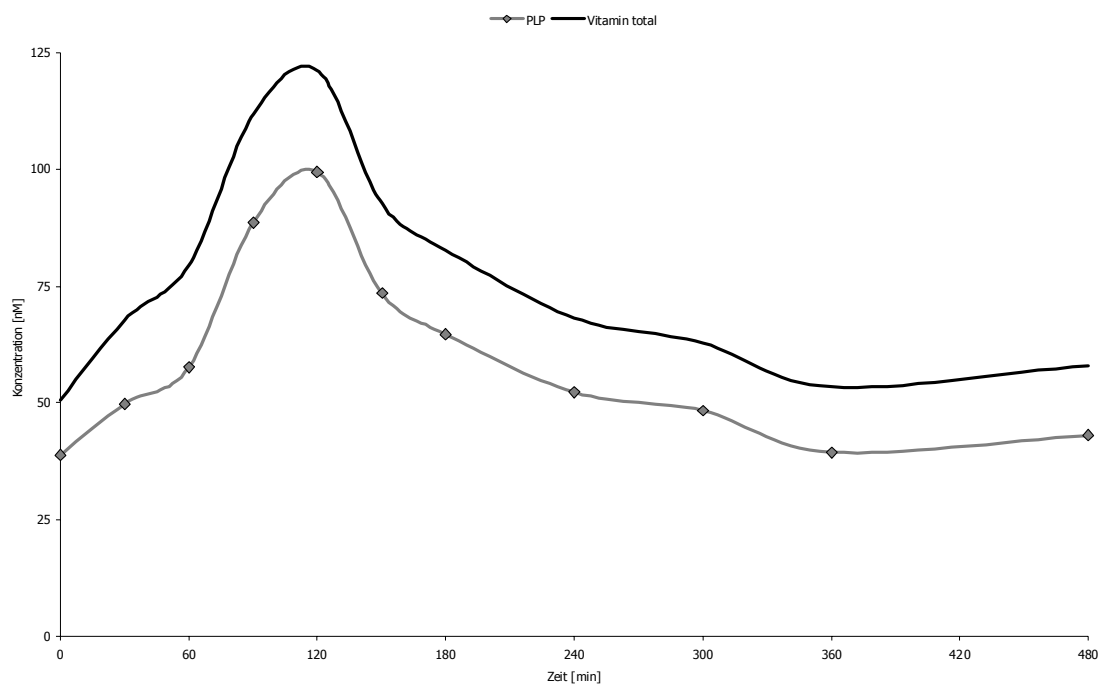
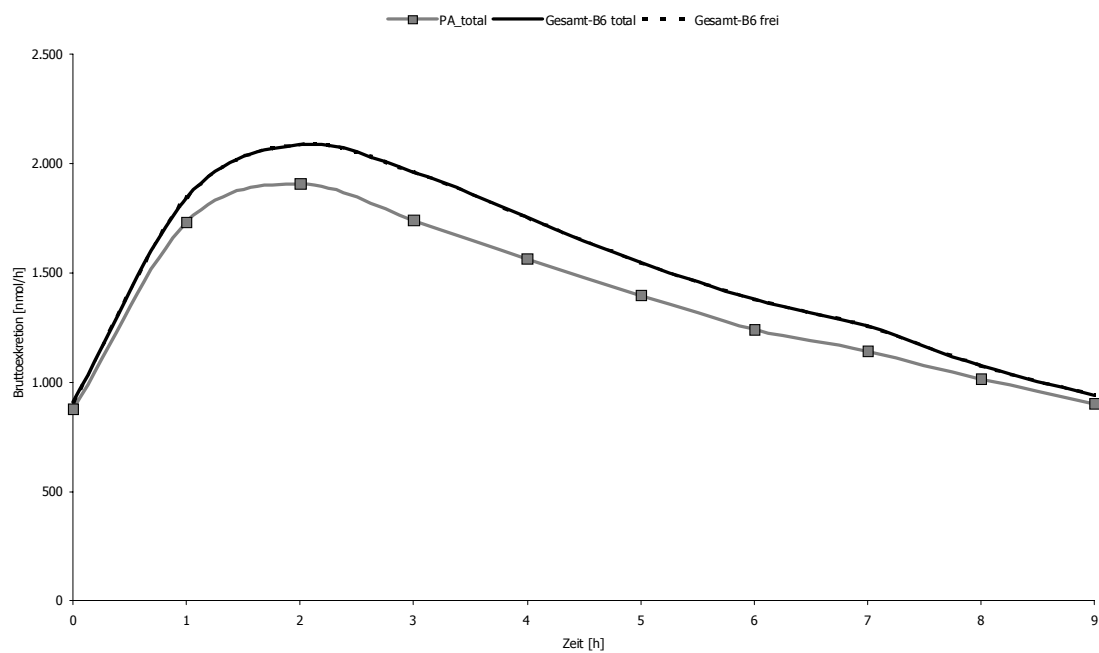


Diagramm 62 Testreihe_4: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_09; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



5 Diagramm 63 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—) je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_09; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

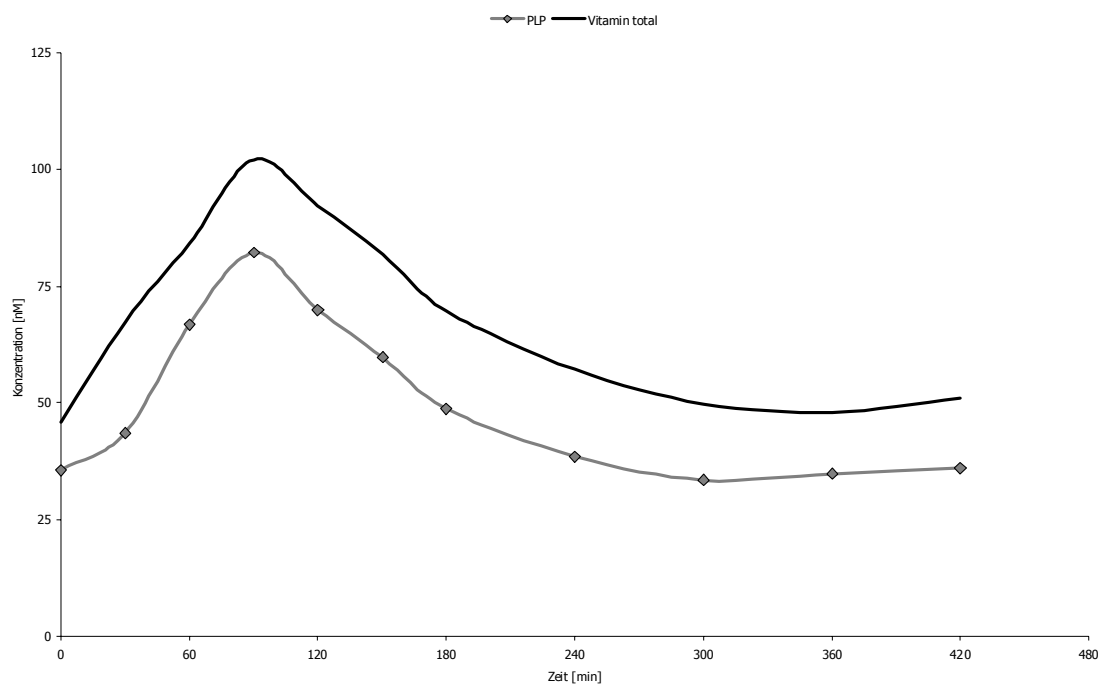
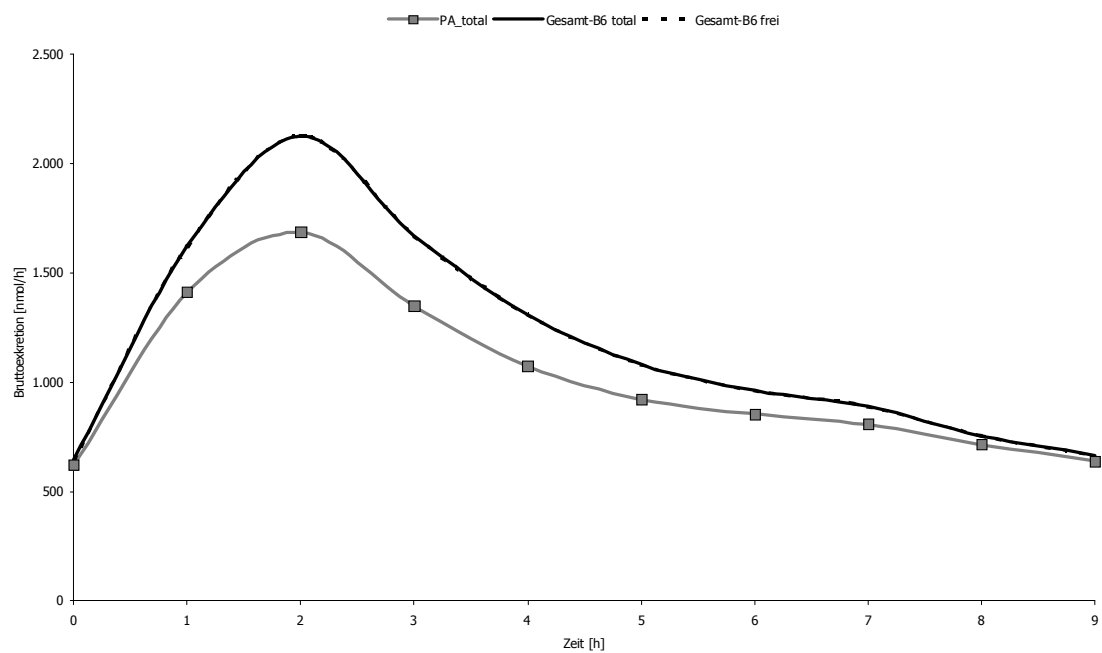


Diagramm 64 Testreihe_4: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_10; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



- 5 Diagramm 65 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—) je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_10; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

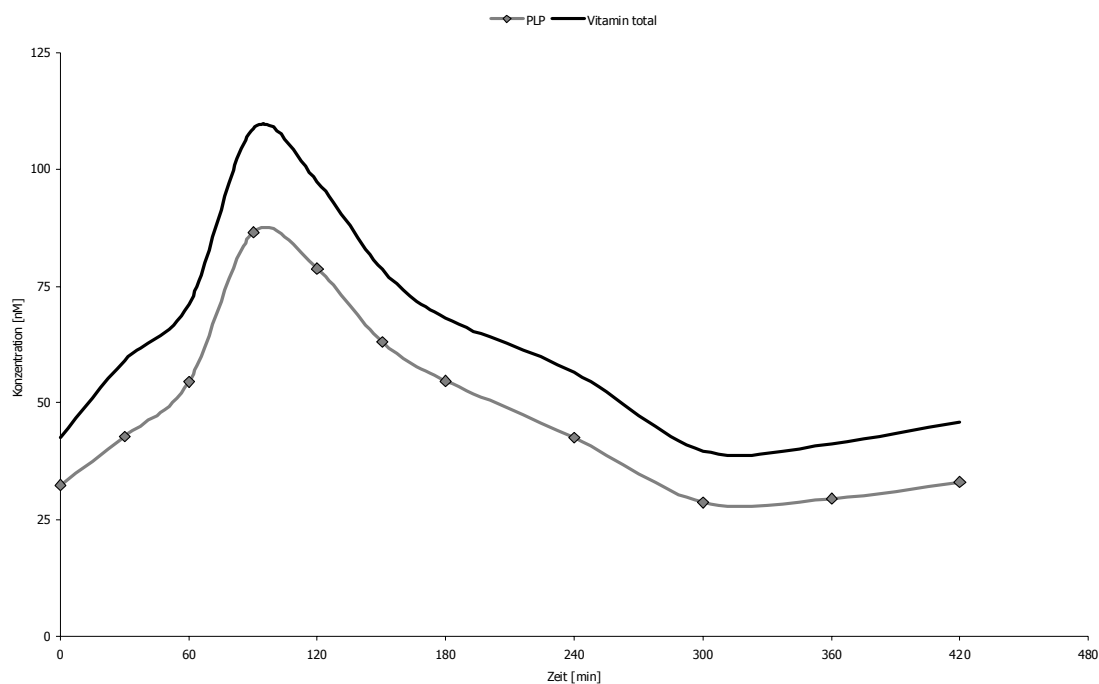
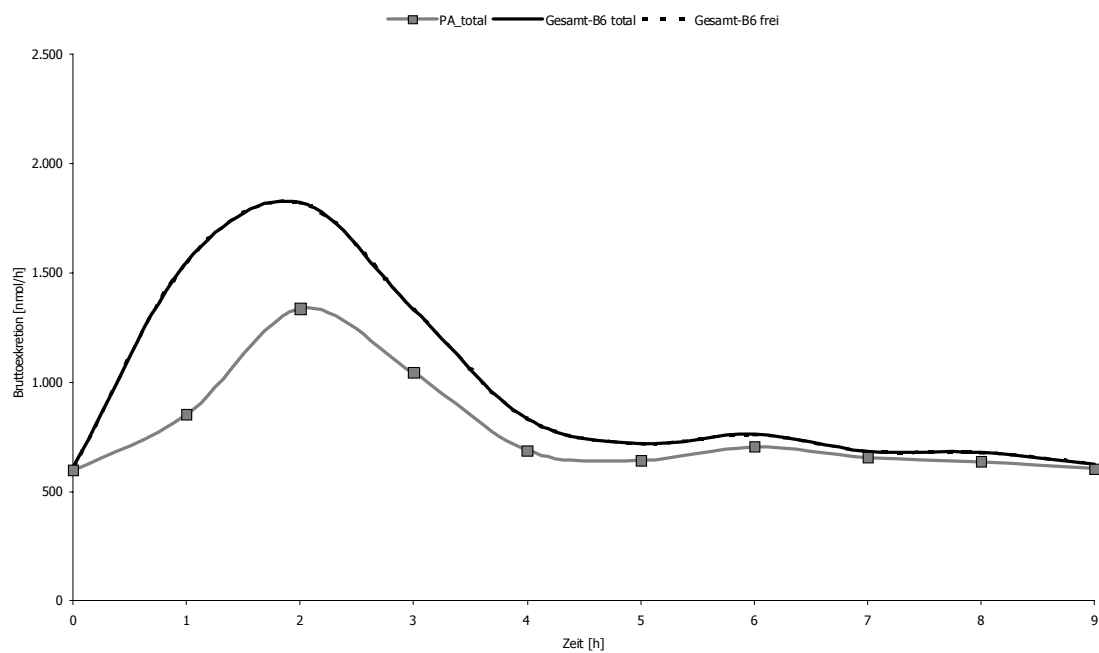


Diagramm 66 Testreihe_4: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_11; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



5 Diagramm 67 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—) je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_11; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

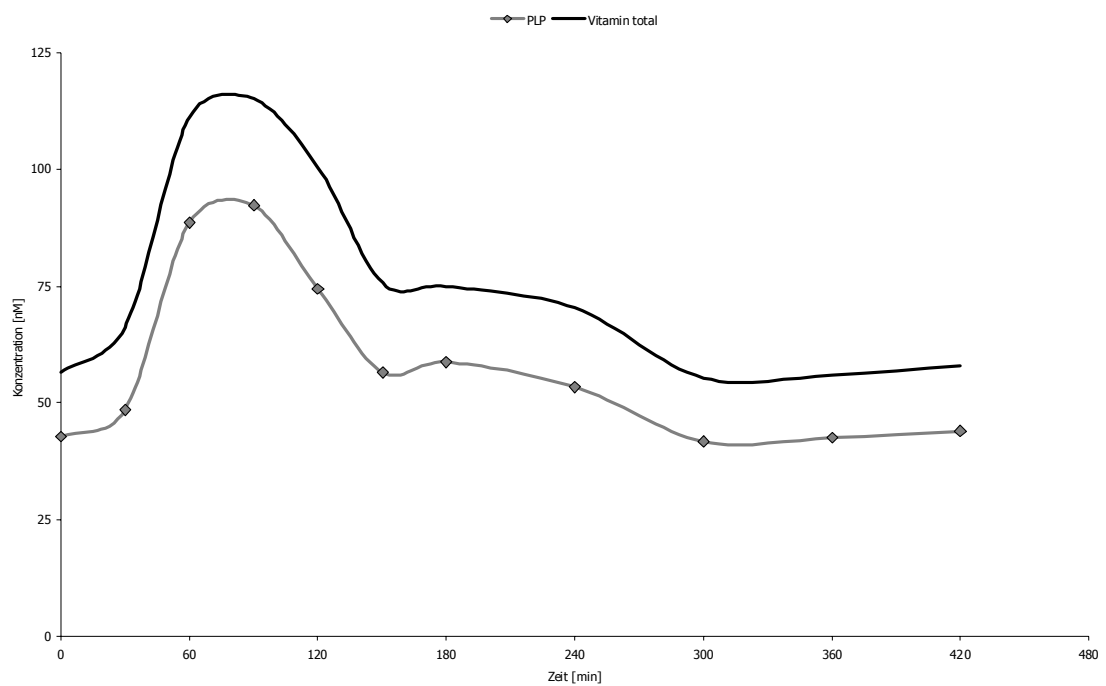
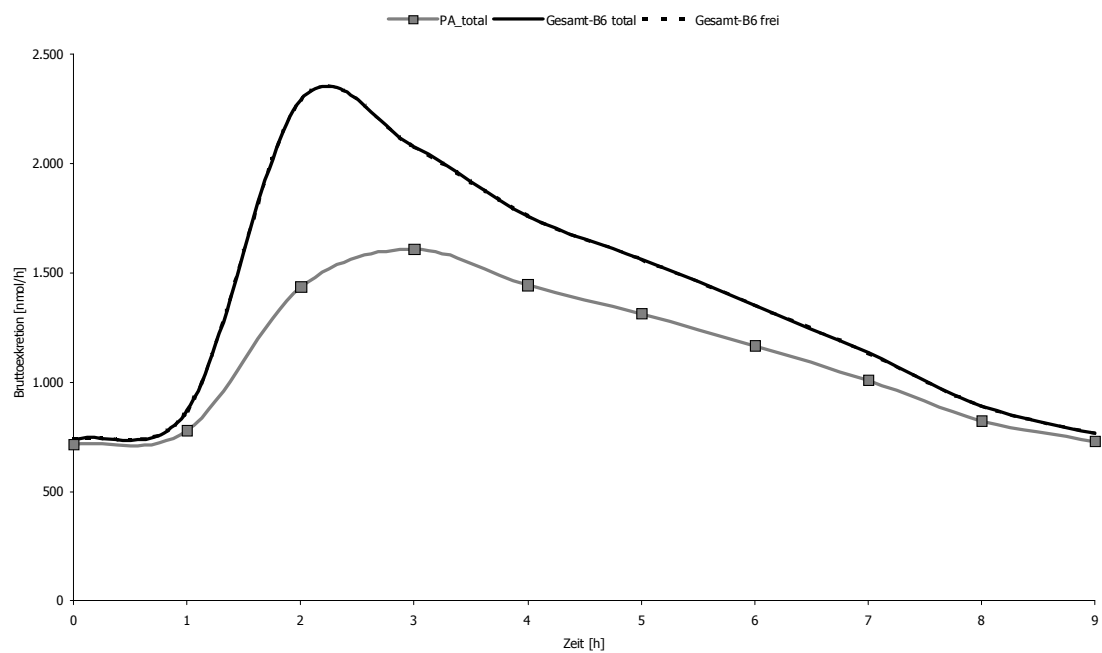


Diagramm 68 Testreihe_4: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_12; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



- 5 Diagramm 69 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—) je Stunde in Testreihe_4, Versuchsperson_12; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

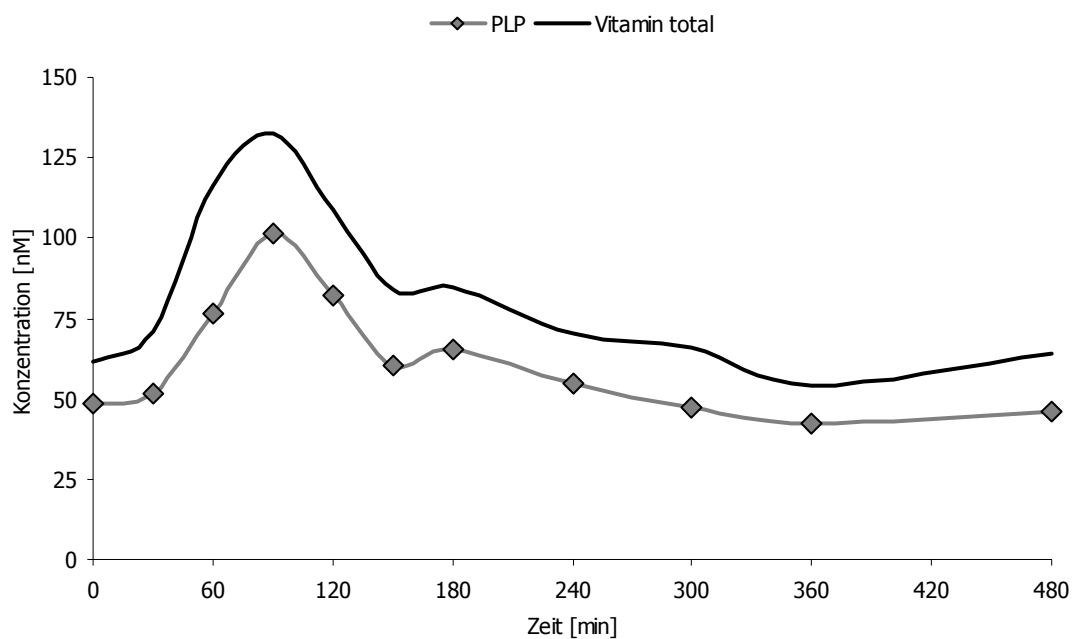
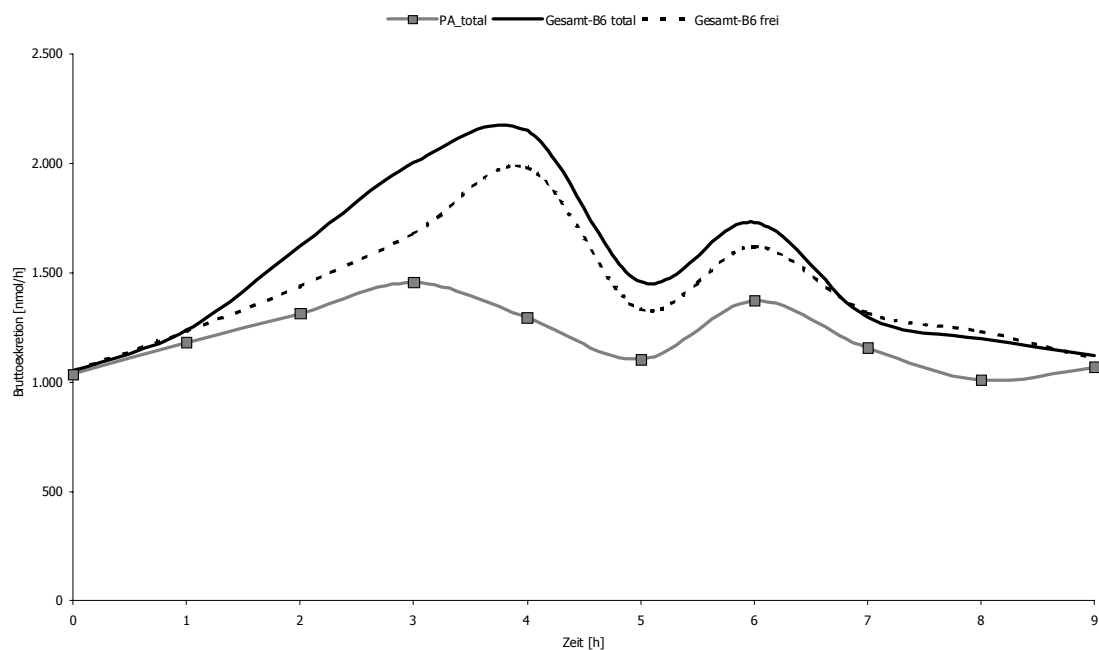


Diagramm 70 Testreihe_5: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_02; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



5 Diagramm 71 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—total, ...frei) je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_02; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

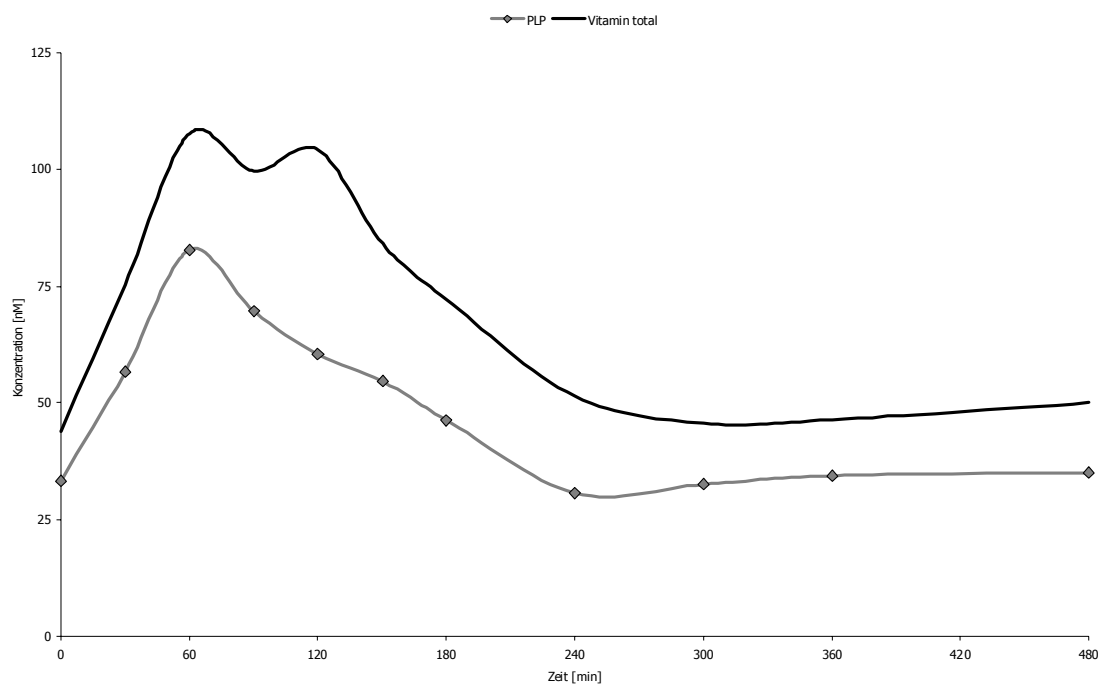
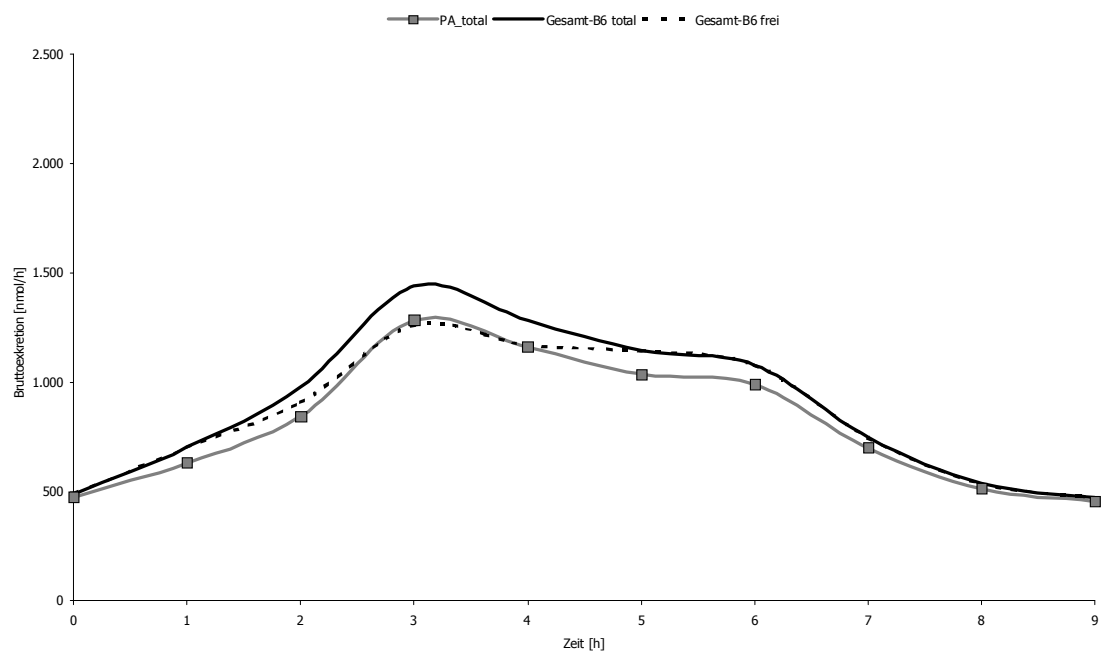


Diagramm 72 Testreihe_5: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_03; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



- 5 Diagramm 73 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—total, ...frei) je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_03; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

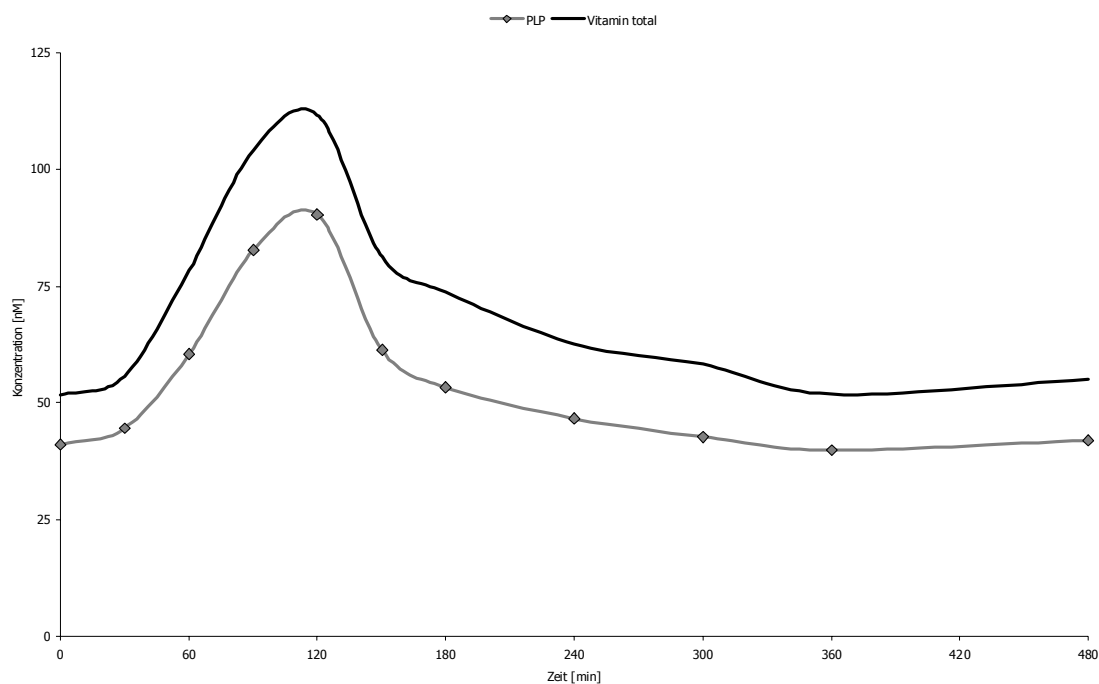
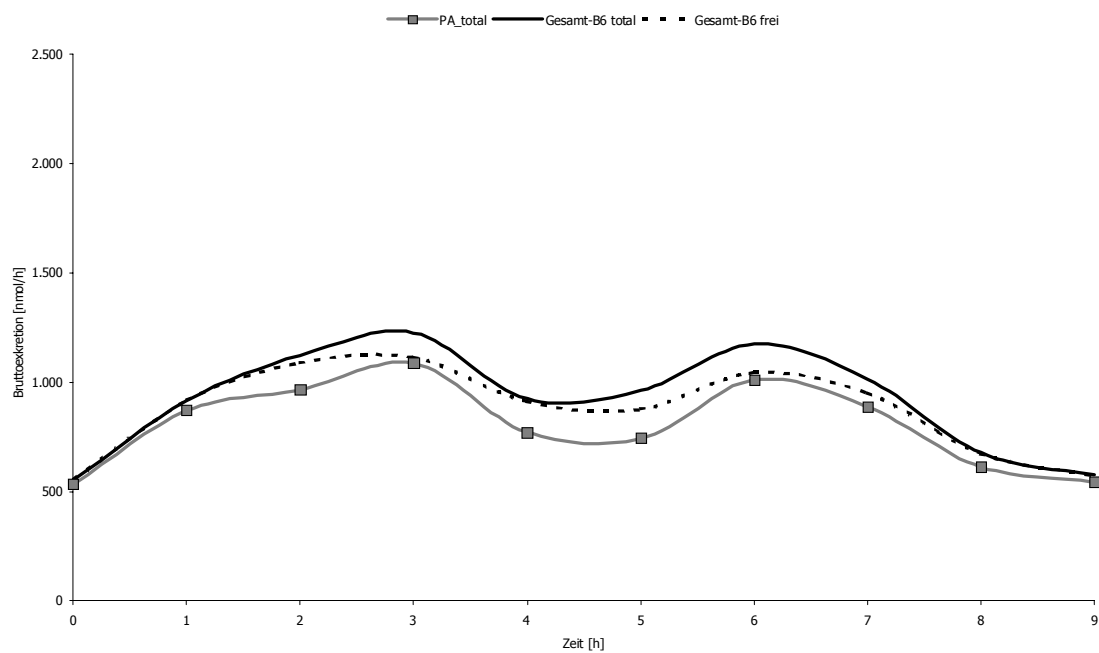


Diagramm 74 Testreihe_5: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_04; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



5 Diagramm 75 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—total, ...frei) je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_04; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

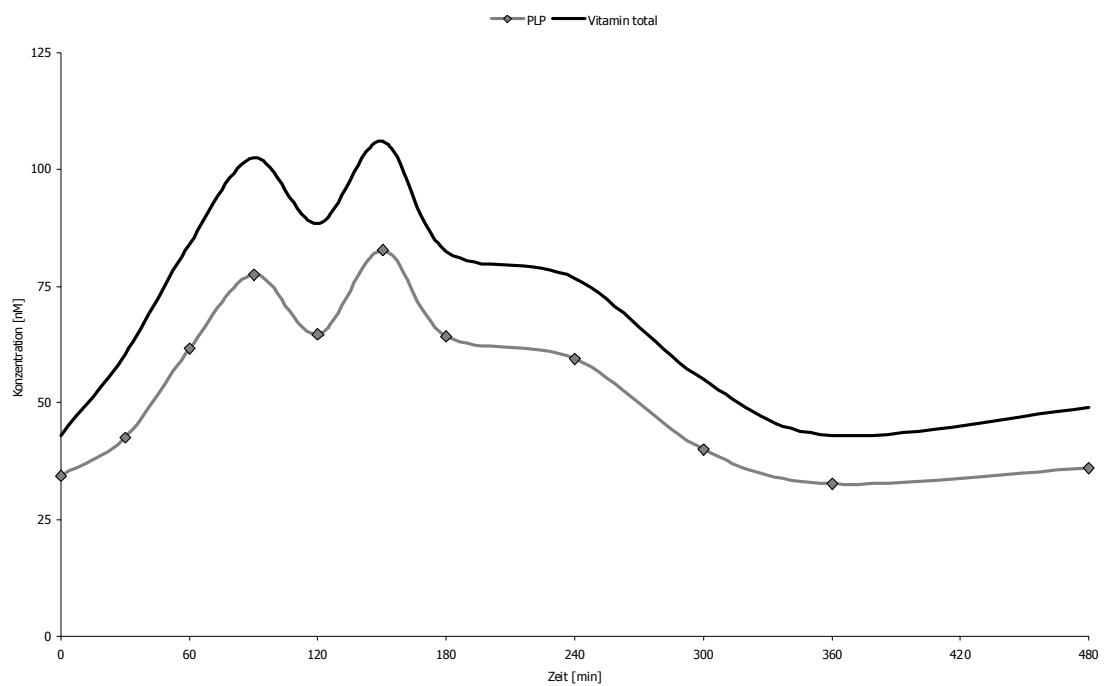
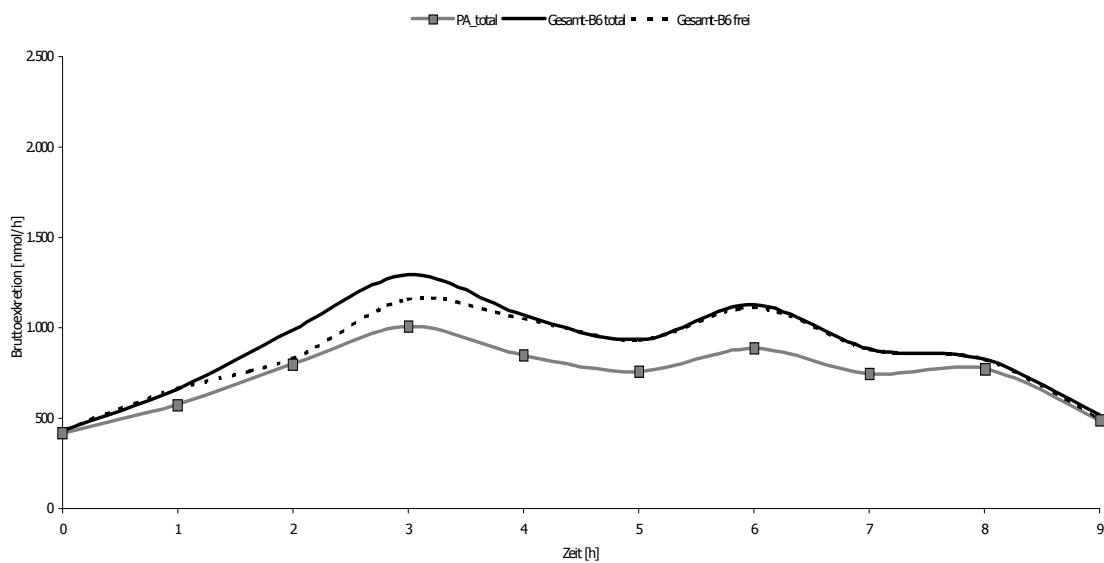


Diagramm 76 Testreihe_5: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_05; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



- 5 Diagramm 77 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—total, ...frei) je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_05; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

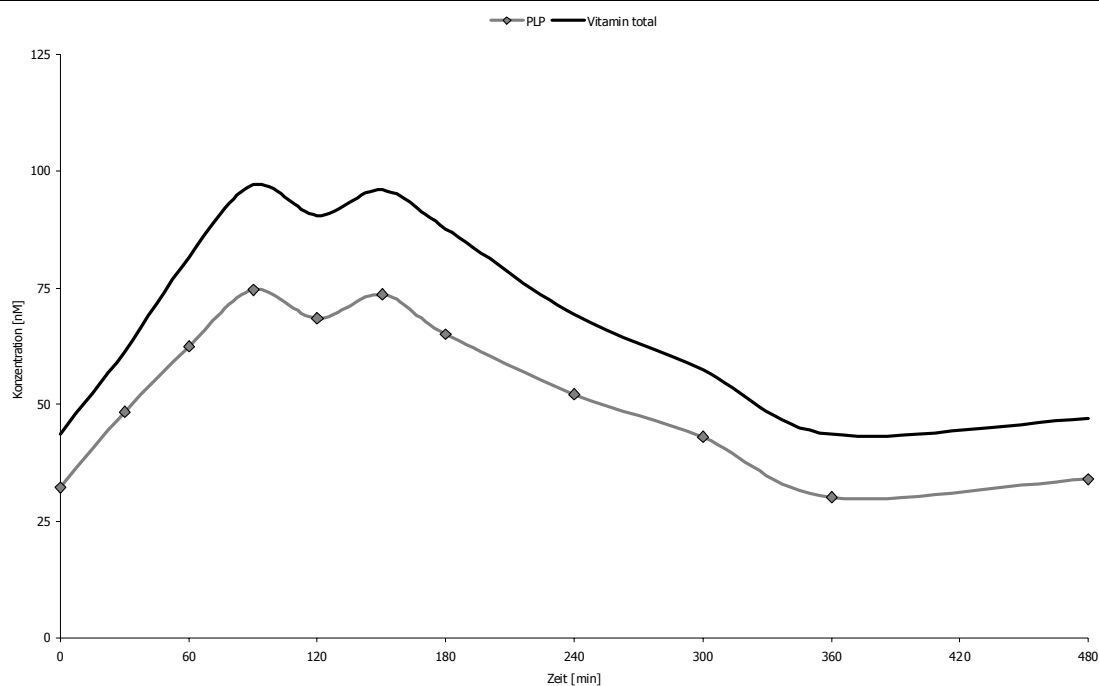
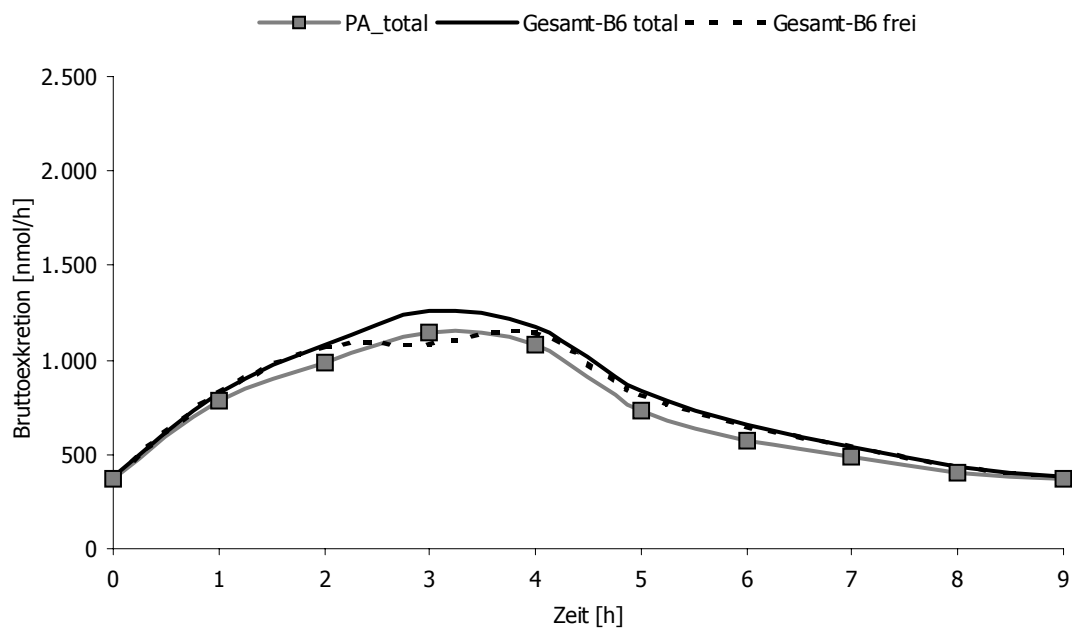


Diagramm 78 Testreihe_5: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_06; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



5 Diagramm 79 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—total, ...frei) je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_06; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

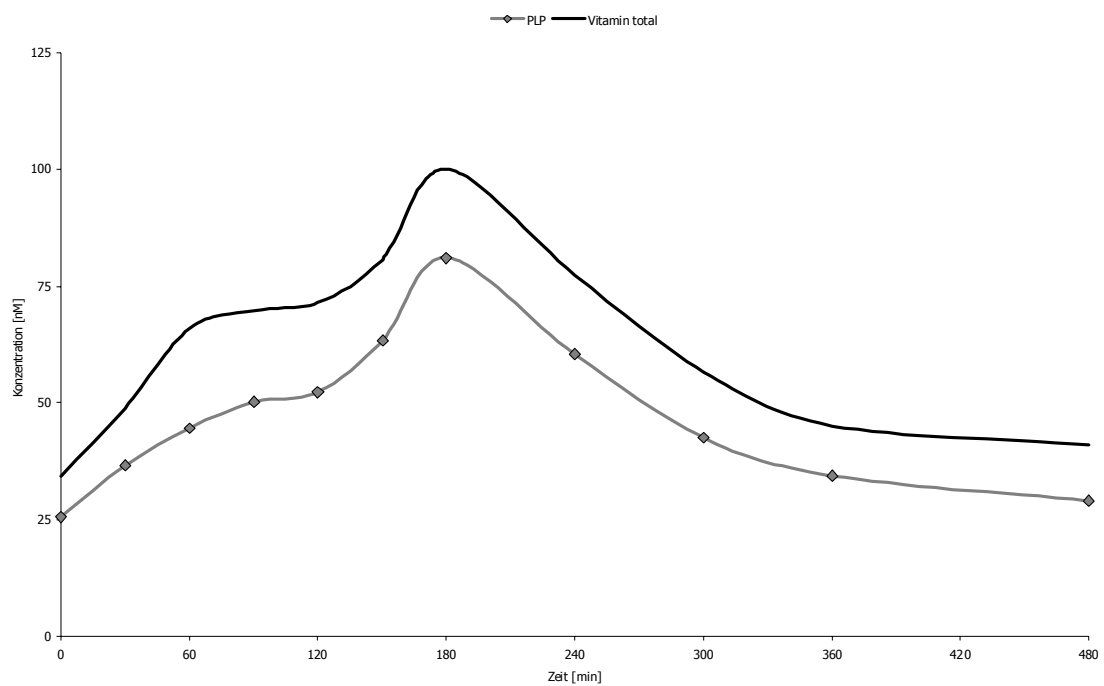
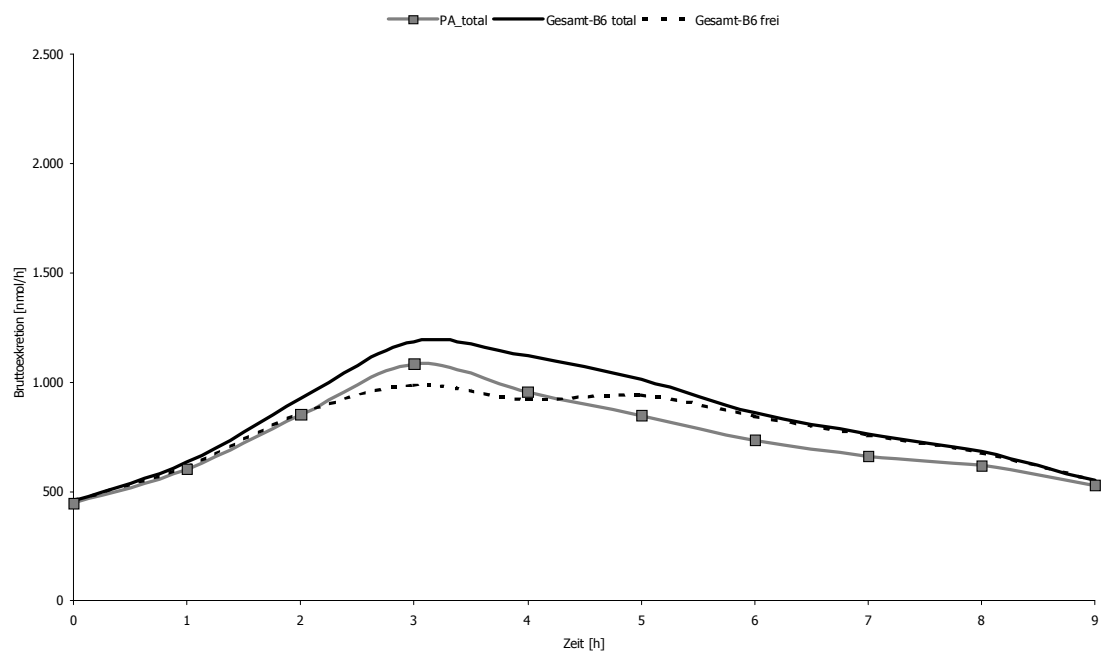


Diagramm 80 Testreihe_5: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_07; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



- 5 Diagramm 81 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—total, ...frei) je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_07; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

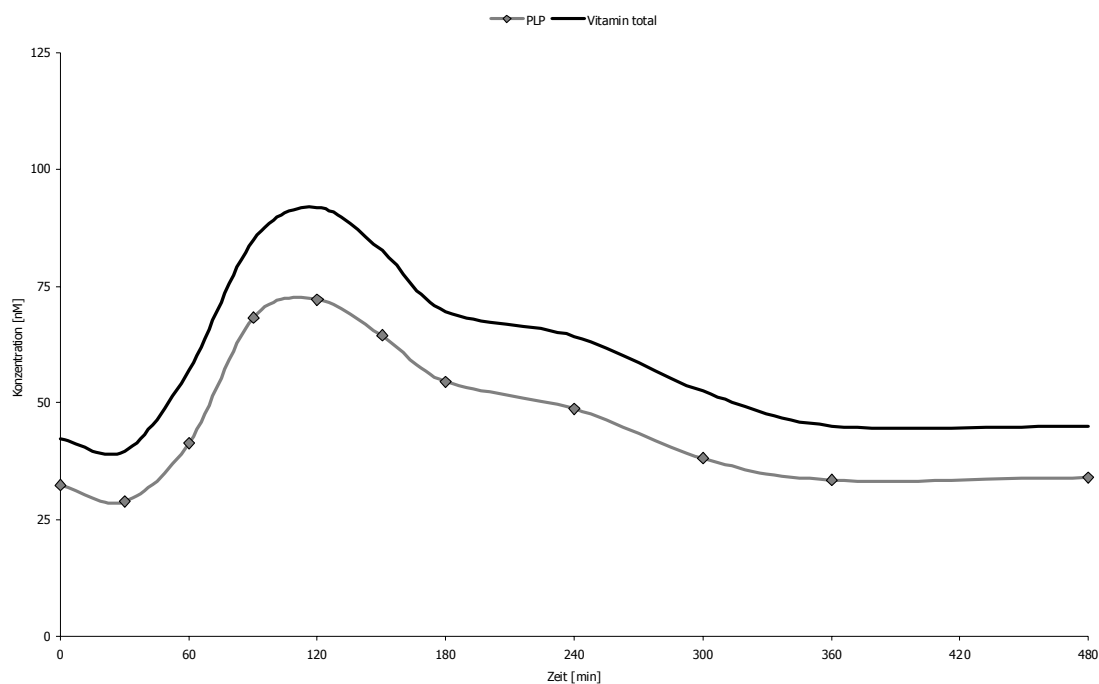
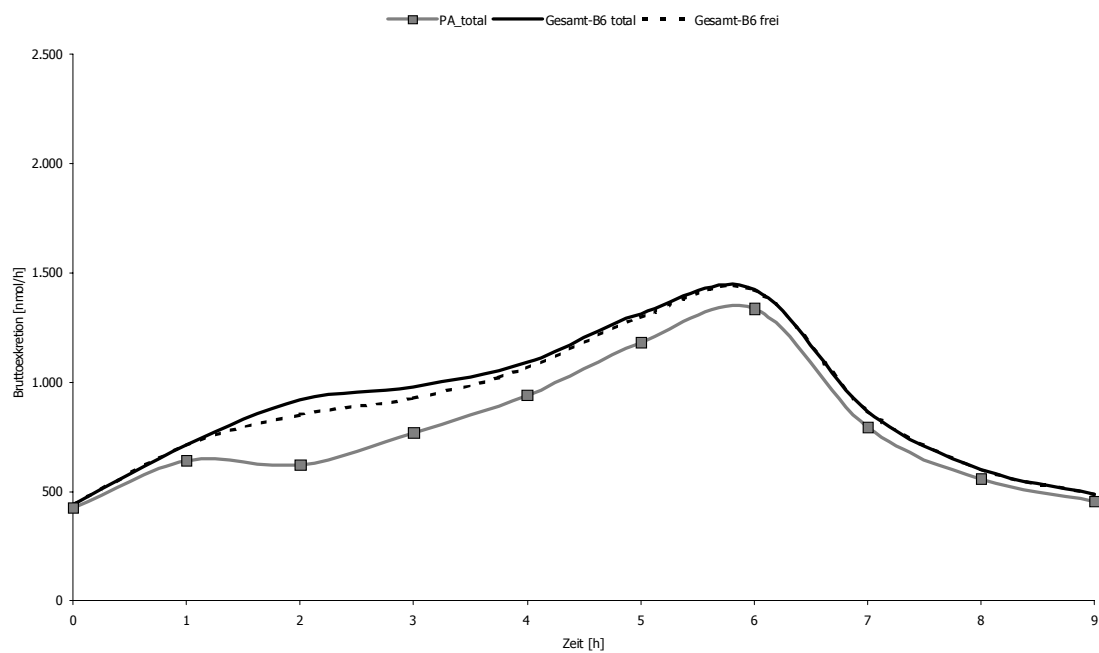


Diagramm 82 Testreihe_5: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_08; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



5 Diagramm 83 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—total, ...frei) je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_08; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

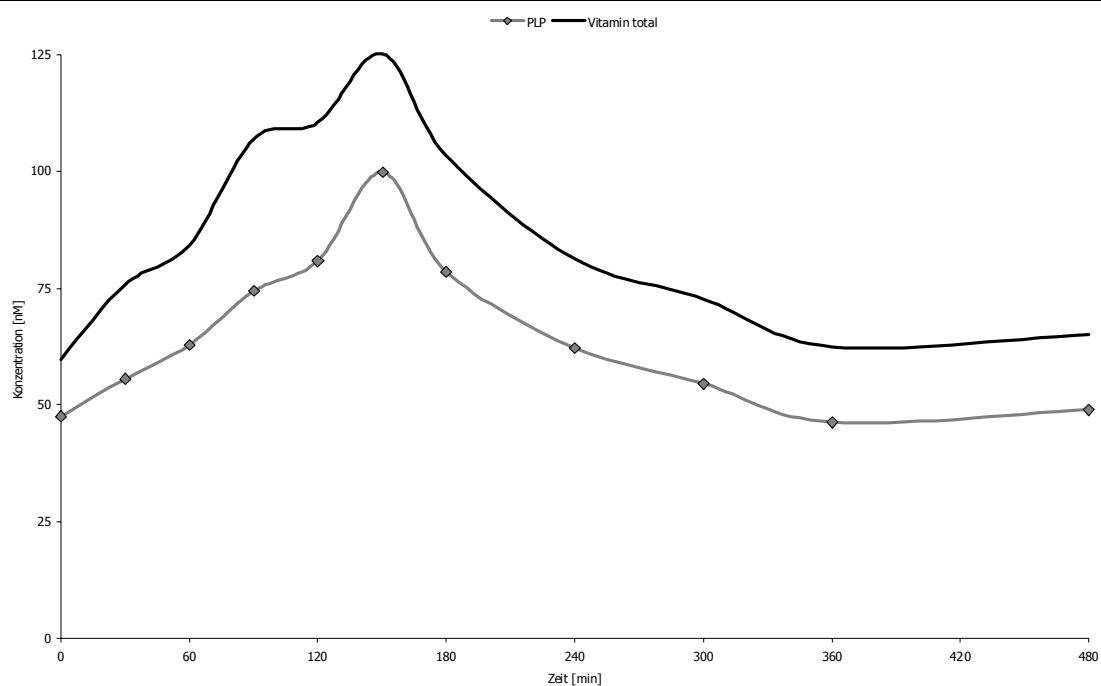
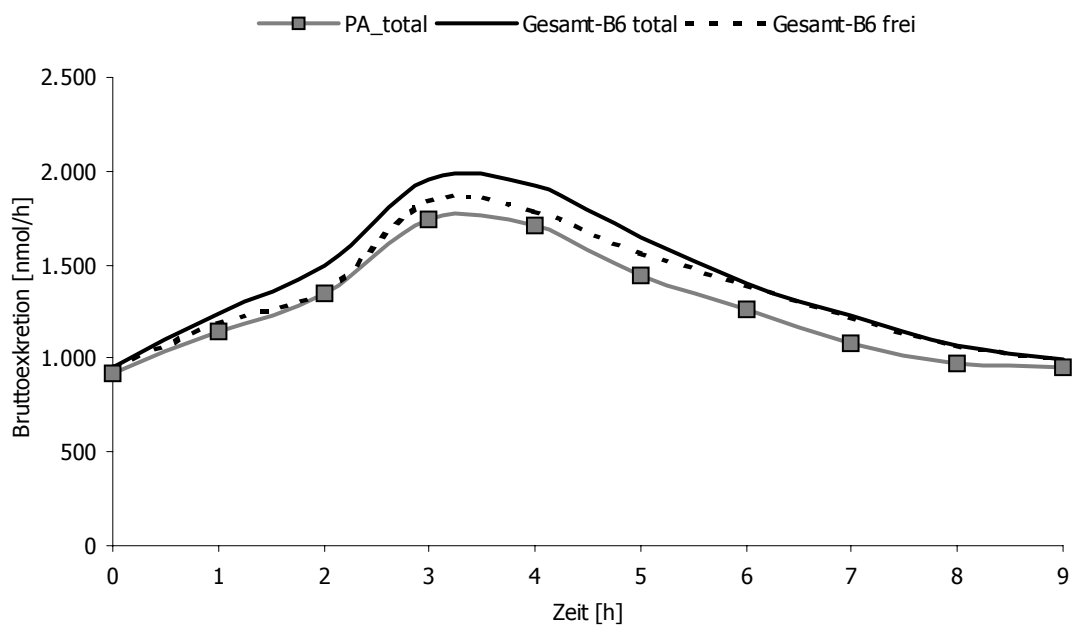


Diagramm 84 Testreihe_5: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_09; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



- 5 Diagramm 85 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—total, ...frei) je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_09; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

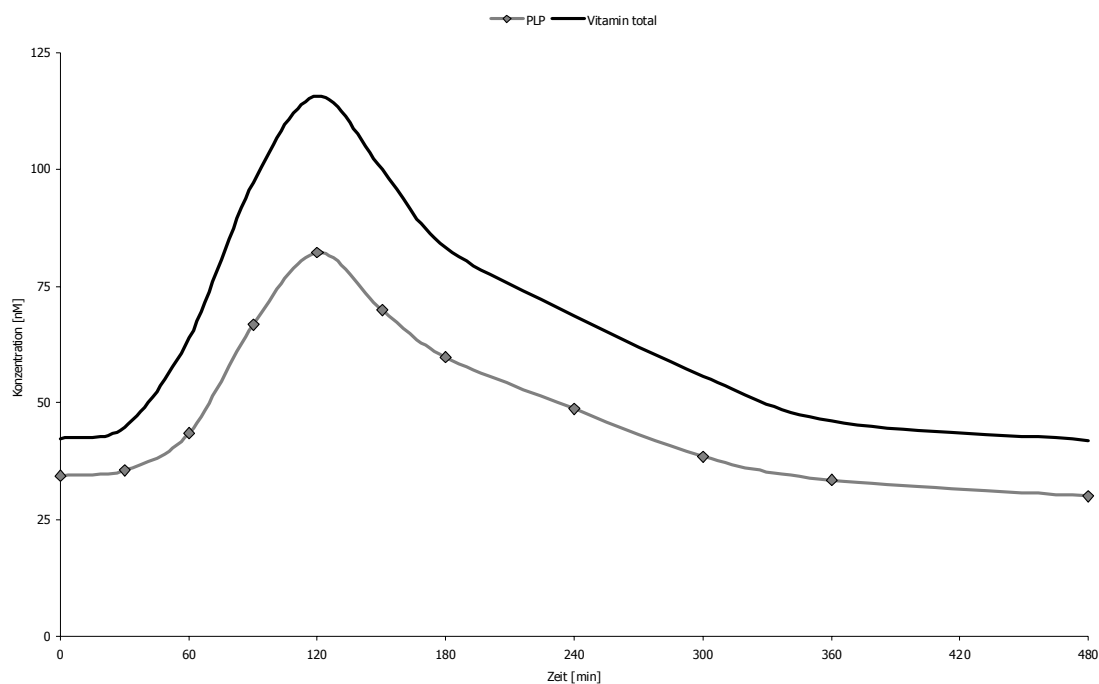
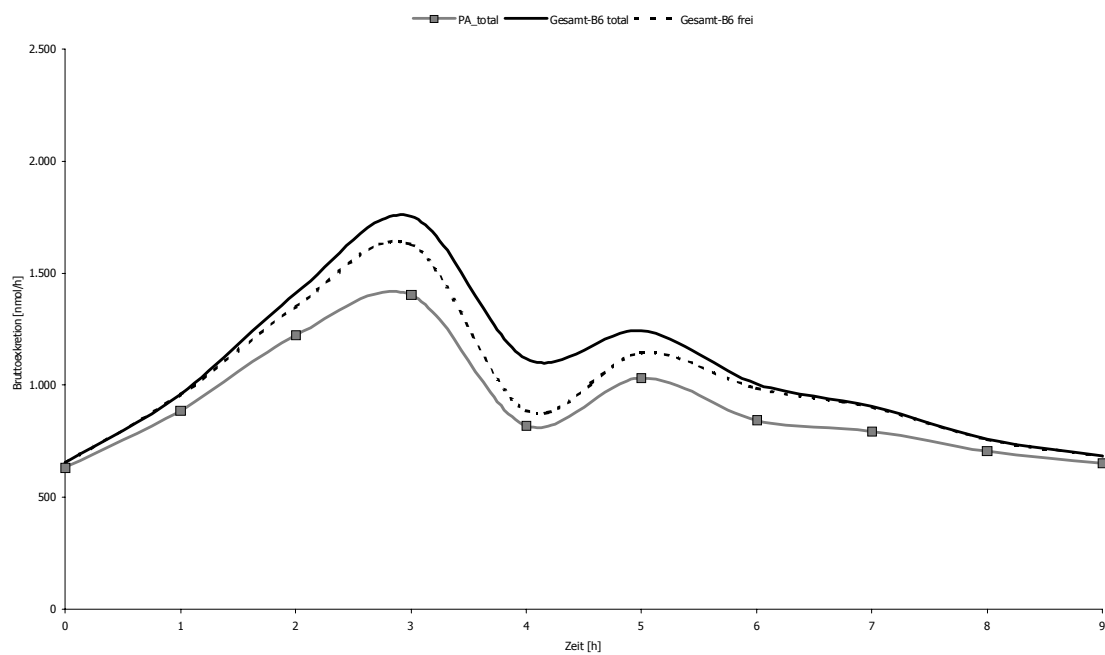


Diagramm 86 Testreihe_5: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_10; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



5 Diagramm 87 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—total, ...frei) je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_10; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

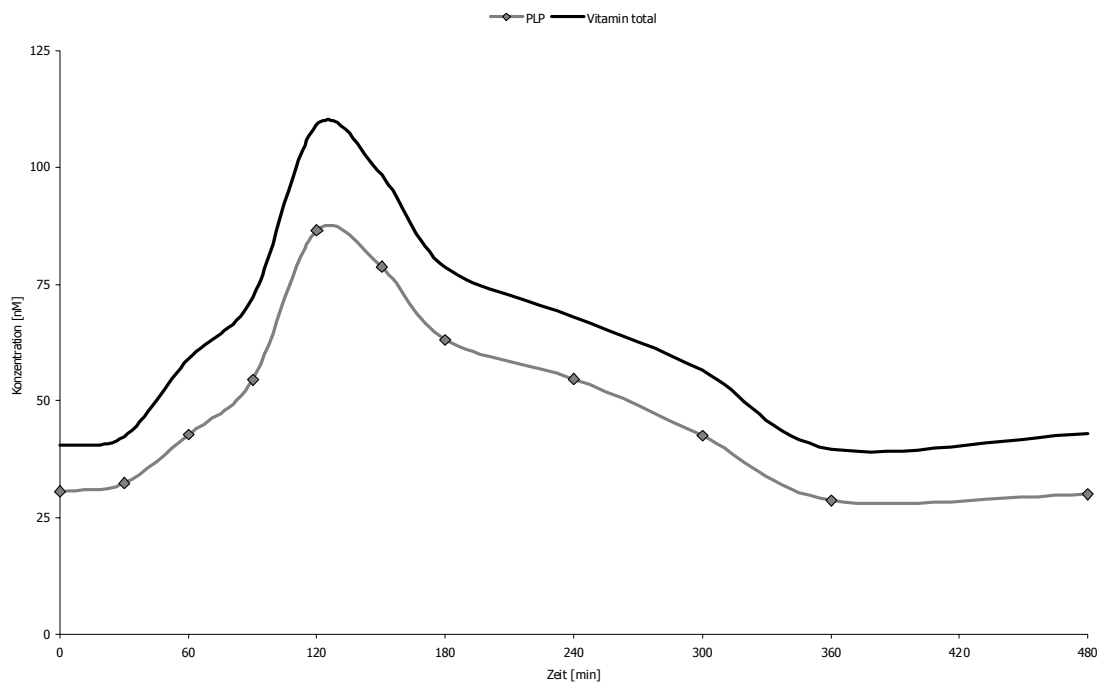
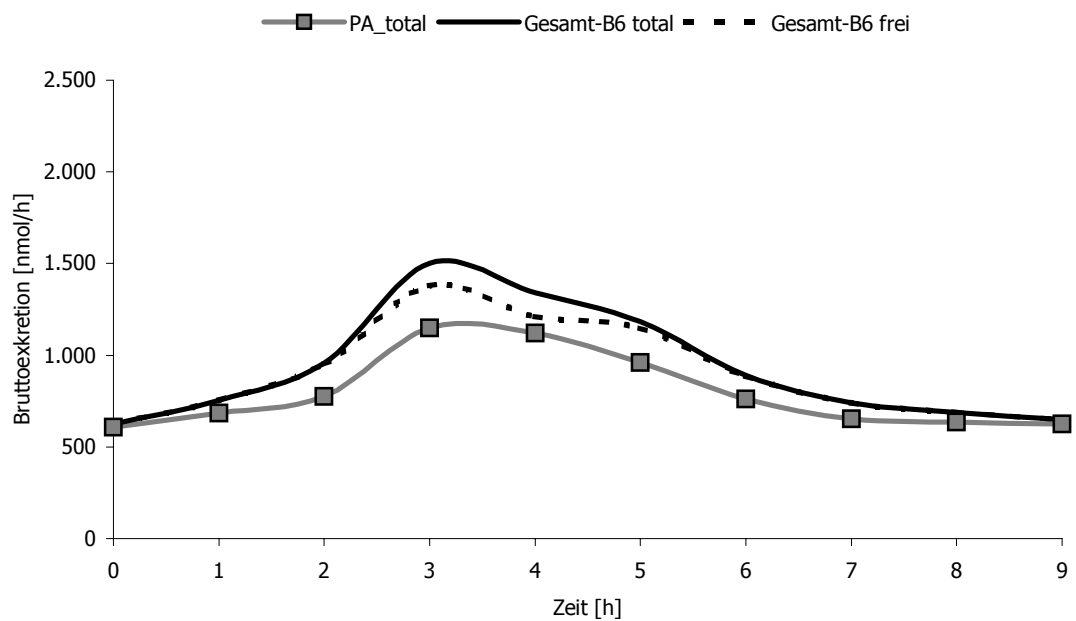


Diagramm 88 Testreihe_5: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_11; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nmol]



- 5 Diagramm 89 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—total, ...frei) je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_11; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

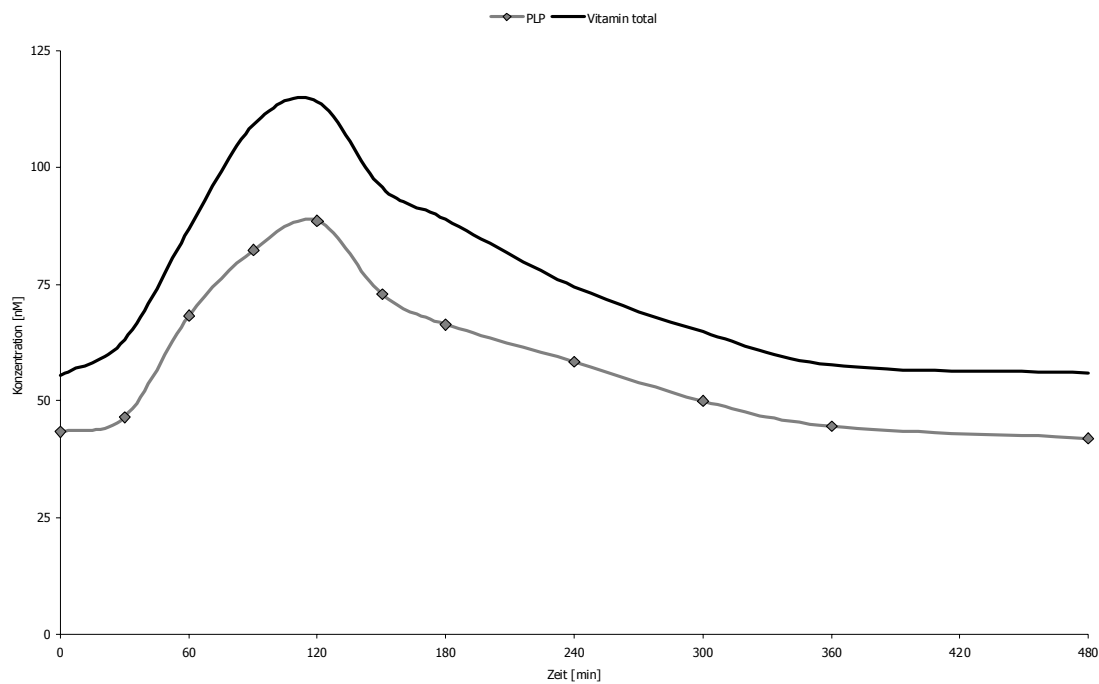
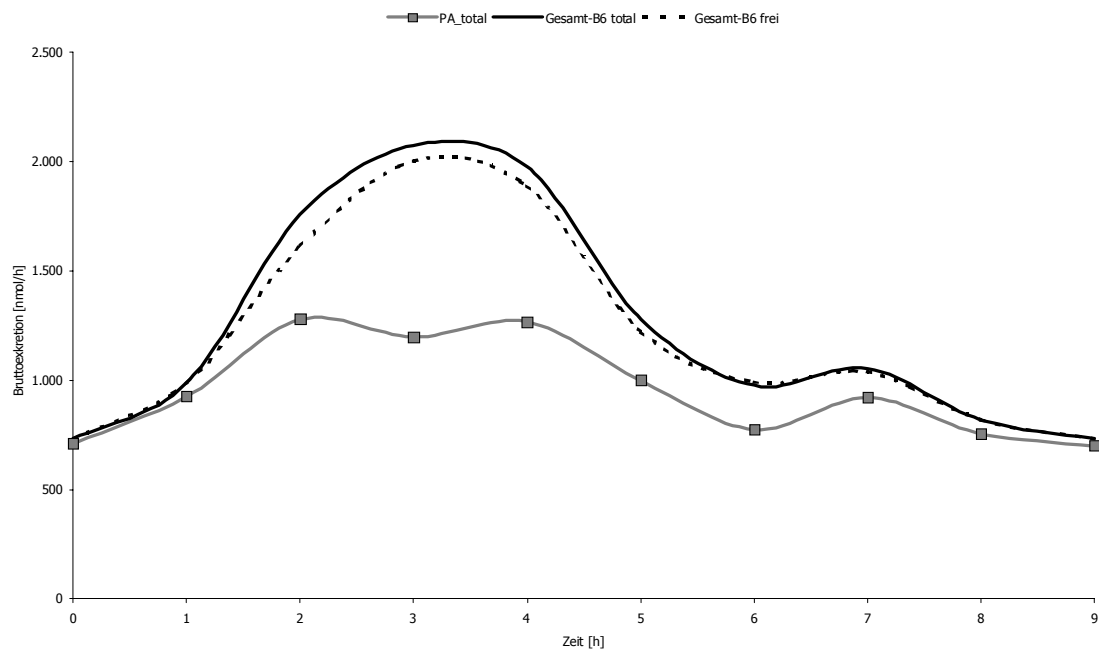


Diagramm 90 Testreihe_5: PLP (—) und Vitamin B6 (—) im Plasma von Versuchsperson_12; x-Achse: Zeit nach Applikation [min], y-Achse: Konzentration [nM]



- 5 Diagramm 91 Exkretion PA (—) und <Vitamin B6+PA> (—total, ...frei) je Stunde in Testreihe_5, Versuchsperson_12; x-Achse: Zeit nach Applikation [h], y-Achse: Exkretion [nmol/h]

7.2.1.4. Kinetische Auswertungen

Hier sind diejenigen Diagramme nachgetragen, die nicht im Ergebnisteil enthalten sind; Erläuterung siehe dort.

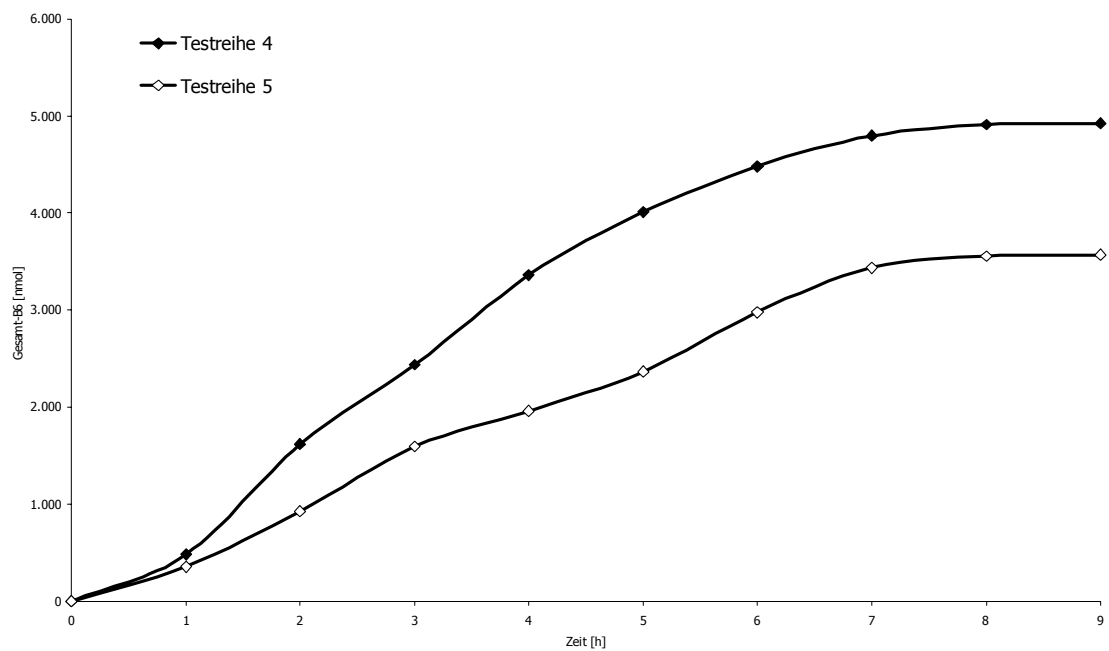
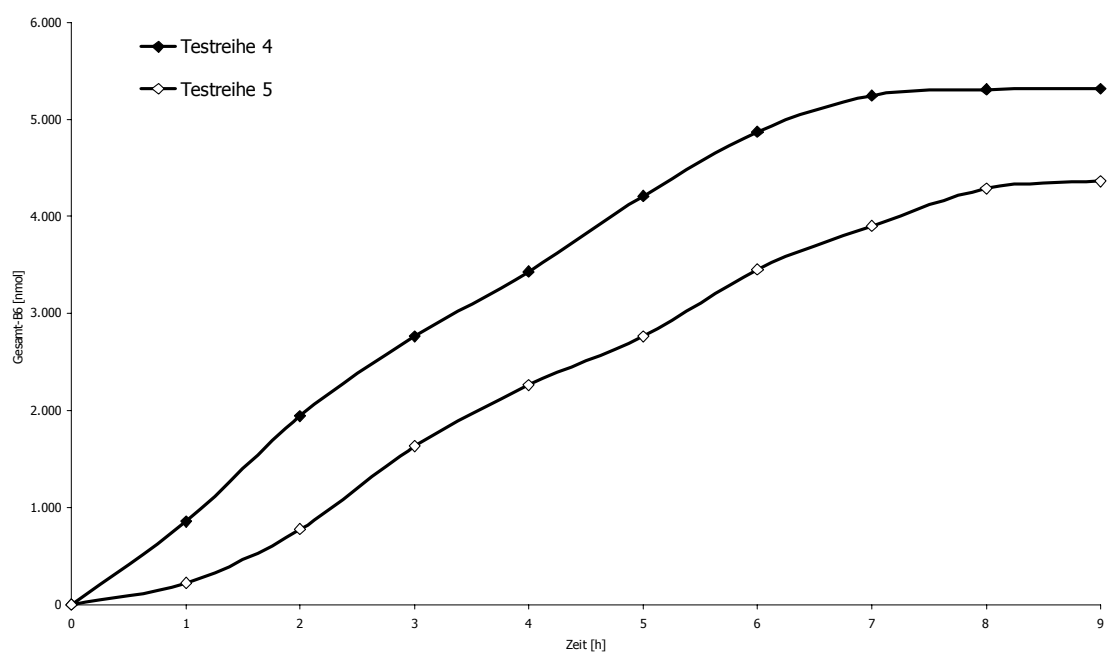


Diagramm 92 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_04 nach zwei Testreihen; x-Achse: Zeit [h], y-Achse: exkretierte Menge [nmol]



5 Diagramm 93 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_05 nach zwei Testreihen; x-Achse: Zeit [h], y-Achse: exkretierte Menge [nmol]

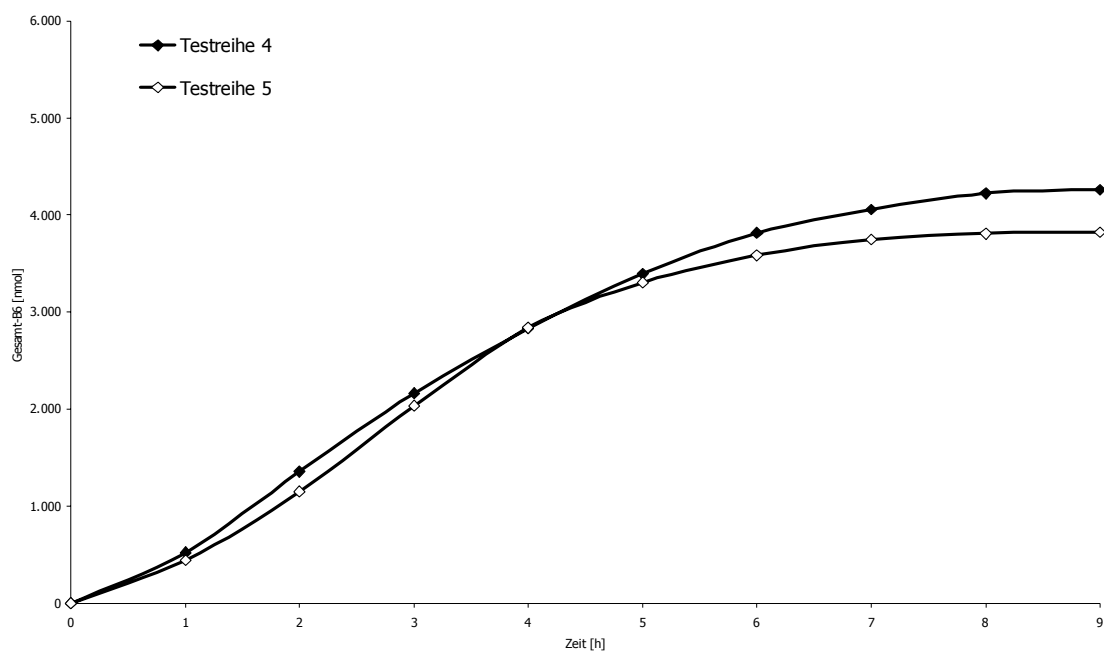
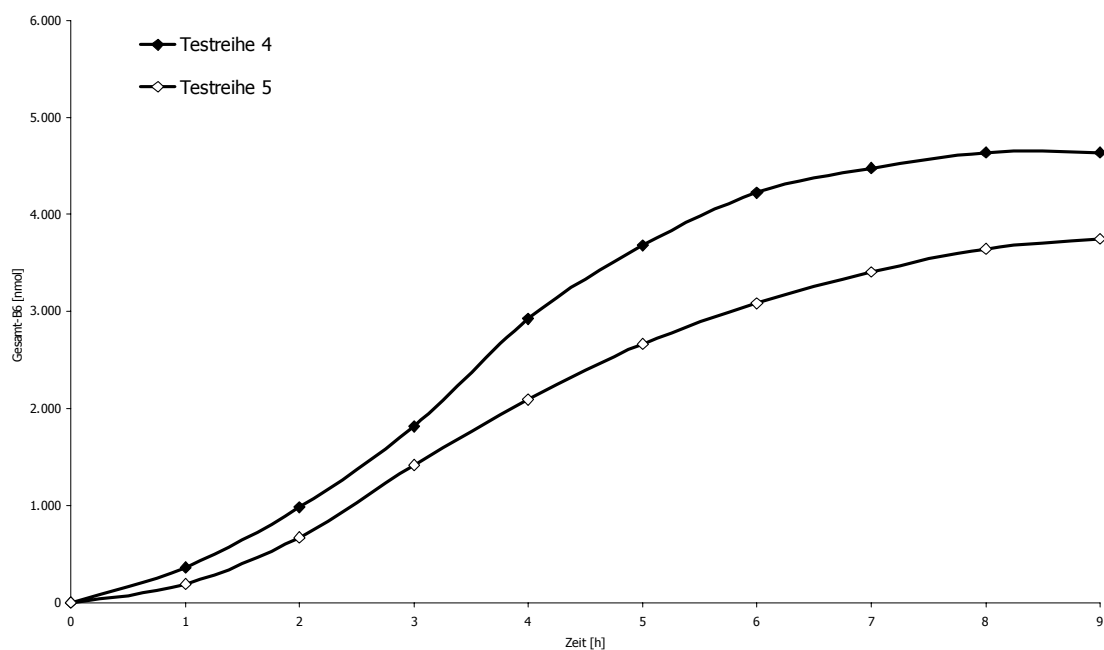


Diagramm 94 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_06 nach zwei Testreihen; x-Achse: Zeit [h], y-Achse: exkretierte Menge [nmol]



5 Diagramm 95 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_07 nach zwei Testreihen; x-Achse: Zeit [h], y-Achse: exkretierte Menge [nmol]

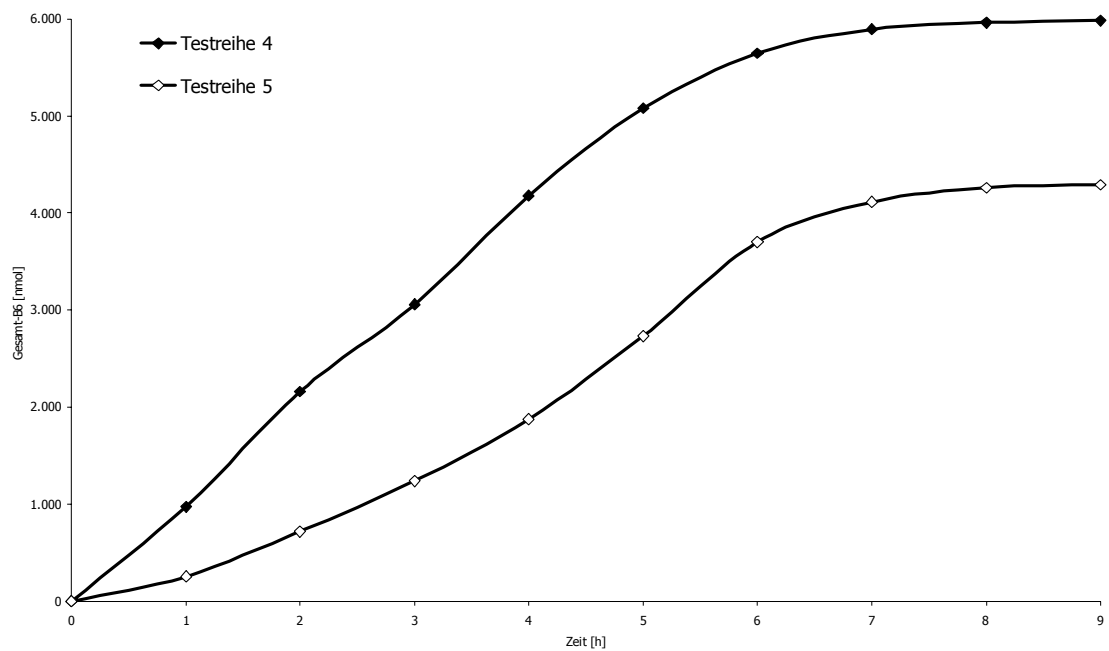
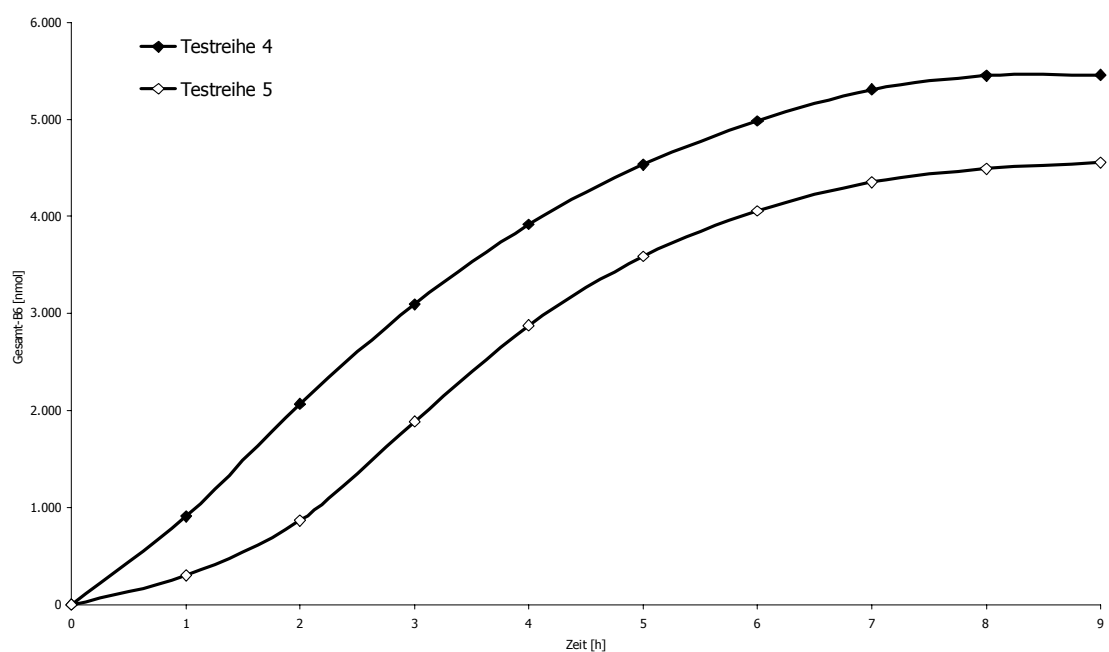


Diagramm 96 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_08 nach zwei Testreihen; x-Achse: Zeit [h], y-Achse: exkretierte Menge [nmol]



5 Diagramm 97 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_09 nach zwei Testreihen; x-Achse: Zeit [h], y-Achse: exkretierte Menge [nmol]

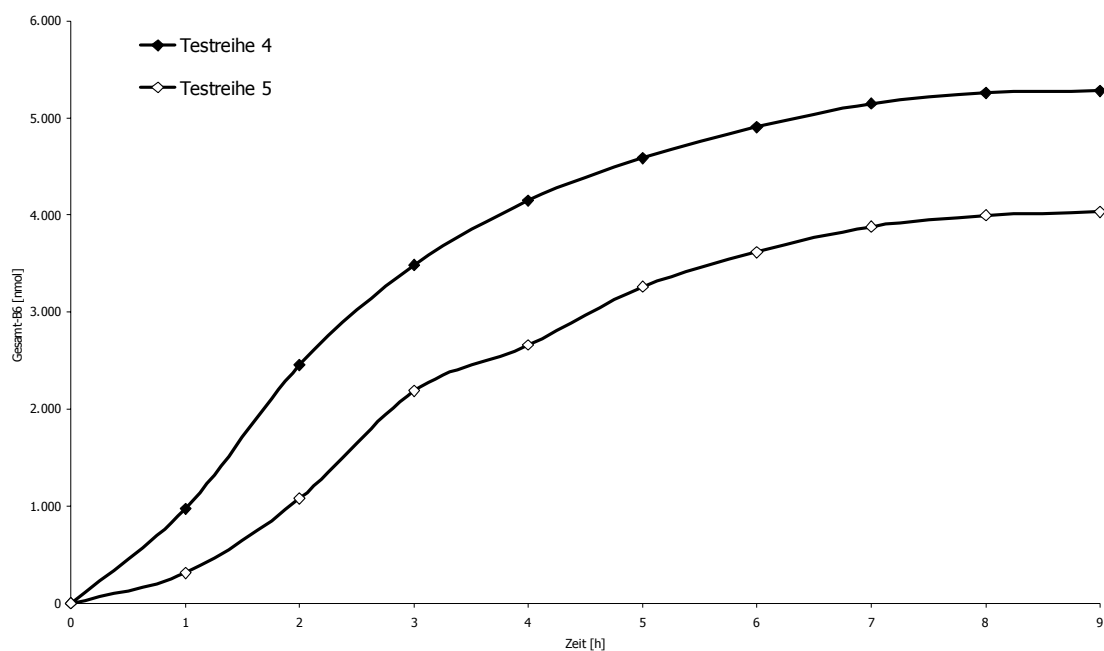
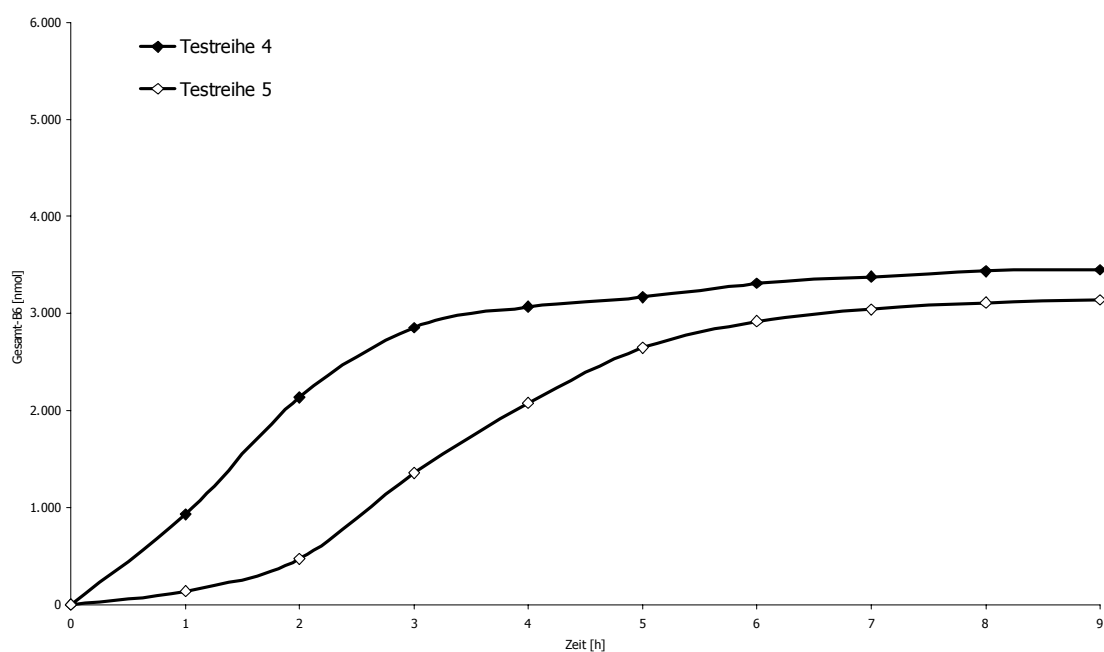


Diagramm 98 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_10 nach zwei Testreihen; x-Achse: Zeit [h], y-Achse: exkretierte Menge [nmol]



5 Diagramm 99 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_11 nach zwei Testreihen; x-Achse: Zeit [h], y-Achse: exkretierte Menge [nmol]

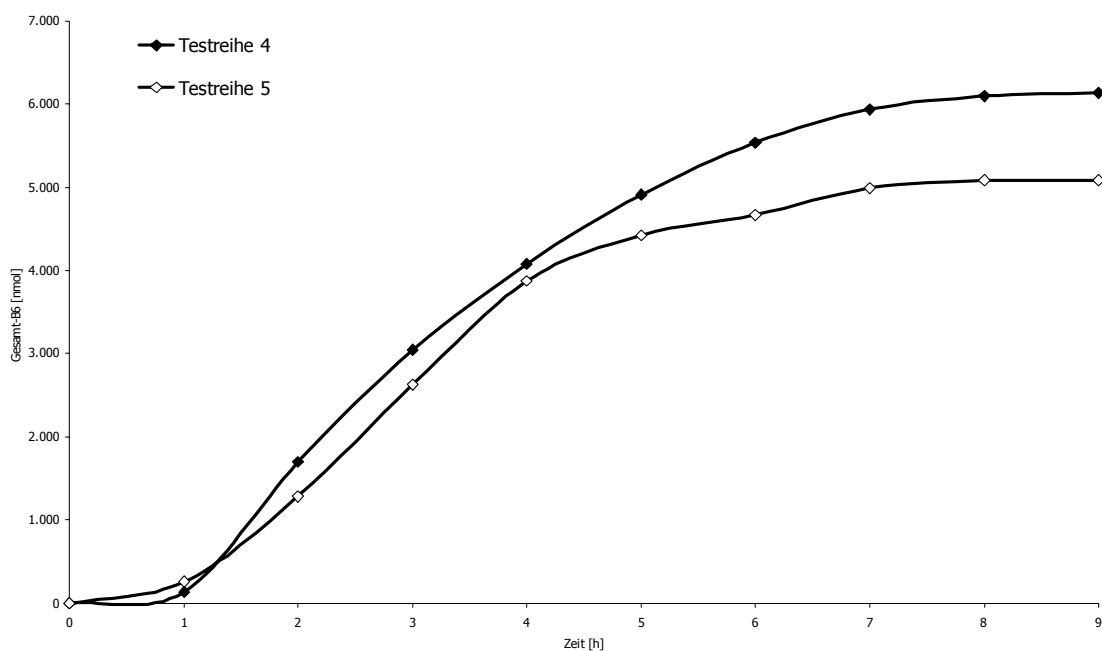


Diagramm 100 Nettoexkretion von totalem <Vitamin B6+PA> bei Versuchsperson_12 nach zwei Testreihen; x-Achse: Zeit [h], y-Achse: exkretierte Menge [nmol]

- 5 In der nächsten Tabelle sind biokinetische Parameter zusammengestellt, die mit Hilfe eines mathematischen Zwei-Kompartiment-Modelles aus den Daten für (totales) <Vitamin B6+PA> ermittelt wurden. Die zugehörigen Verlaufskurven sind in folgenden Diagrammen wiedergegeben.
- 10 Tabelle 98 Biokinetische Parameter und Kenngrößen zur Modellzuverlässigkeit für Versuchspersonen (VP) 04 bis 12 in den Testreihen (T) 4 und 5.

	VP04		VP05		VP06		VP07		VP08	
Parameter	T 4	T 5	T 4	T 5	T 4	T 5	T 4	T 5	T 4	T 5
$T_{\max}$ [min]	96	91	89	110	100	98	98	140	120	110
$C_{\max}$ [nM]	50	47	50	56	42	52	49	48	50	44
AUC_{Modell} [nM·min]	9.200	7.900	8.200	13.000	8.100	10.000	10.000	15.000	13.000	9.800
b_1 [min ⁻¹]	1,0	0,24	14	0,14	0,69	0,29	0,013	0,096	0,21	0,21
b_2 [min ⁻¹]	0,015	0,16	0,017	0,012	0,014	0,014	0,17	0,0085	0,011	0,012
k_{31} [min ⁻¹]	1,0	0,24	14	0,14	0,69	0,29	0,17	0,096	0,21	0,21
k_{1e} [min ⁻¹]	0,015	0,016	0,017	0,012	0,014	0,014	0,013	0,0085	0,011	0,012
k_{13} [min ⁻¹]	0,0003 0	0,0000 35	0,056	0,0000 67	0,0000 86	0,0000 88	0,0000 19	0,0001 3	0,0000 65	0,0000 14
k_{01} [min ⁻¹]	0,015	0,016	0,017	0,012	0,014	0,014	0,013	0,0085	0,011	0,012

	VP04		VP05		VP06		VP07		VP08	
Parameter	T 4	T 5	T 4	T 5	T 4	T 5	T 4	T 5	T 4	T 5
t_{lag} [min]	29	30	29	20	29	27	23	19	23	30
t-Wert (0,05)	2,8	3,2	3,2	3,2	2,8	2,8	3,2	2,8	2,3	2,8
Fehler- quadrate	670	560	200	380	140	2000	240	770	1.700	310
B-Wert	0,94	0,93	0,98	0,97	0,98	0,98	,98	0,94	0,88	0,96
SD	13	14	8,1	11	6,0	7,0	9,0	14	21	8,8
Akaike	77	69	60	66	62	65	61	78	86	69
Imbimbo	1,1	1,5	0,83	0,83	0,60	0,57	0,79	0,92	1,4	0,79
	VP09		VP10		VP11		VP12			
Parameter	T 4	T 5	T 4	T 5	T 4	T 5	T 4	T 5		
T_{max} [min]	95	110	52	110	89	120	70	98		
C_{max} [nM]	56	51	50	58	52	49	60	52		
AUC _{Modell} [nM·min]	11.000	12.000	8.400	13.000	9.100	13.000	7.800	10.000		
b_1 [min ⁻¹]	0,29	0,093	1,7	0,096	0,32	0,096	5,5	0,61		
b_2 [min ⁻¹]	0,014	0,012	0,16	0,012	0,015	0,011	0,035	0,014		
k_{31} [min ⁻¹]	0,29	0,092	0,23	0,096	0,32	0,096	4,9	0,61		
k_{1e} [min ⁻¹]	0,014	0,012	0,12	0,012	0,016	0,011	0,040	0,014		
k_{13} [min ⁻¹]	0,0000 32	0,0000 65	1,3	0,0000 58	0,0002 8	0,0000 18	0,59	0,0000 36		
k_{01} [min ⁻¹]	0,014	0,012	0,016	0,012	0,015	0,011	0,014	0,014		
t_{lag} [min]	24	24	24	30	24	30	27	27		
t-Wert (0,05)	2,8	2,8	2,8	3,2	4,3	3,2	2,8	2,8		
Fehler- quadrate	750	740	150	740	600	880	160	200		
B-Wert	0,94	0,94	0,98	0,95	0,94	0,93	0,98	0,98		
SD	14	14	6,2	16	17	17	6,3	7,0		
Akaike	78	78	62	71	63	73	63	65		
Imbimbo	1,0	1,0	0,54	1,2	2,1	1,4	0,60	0,57		

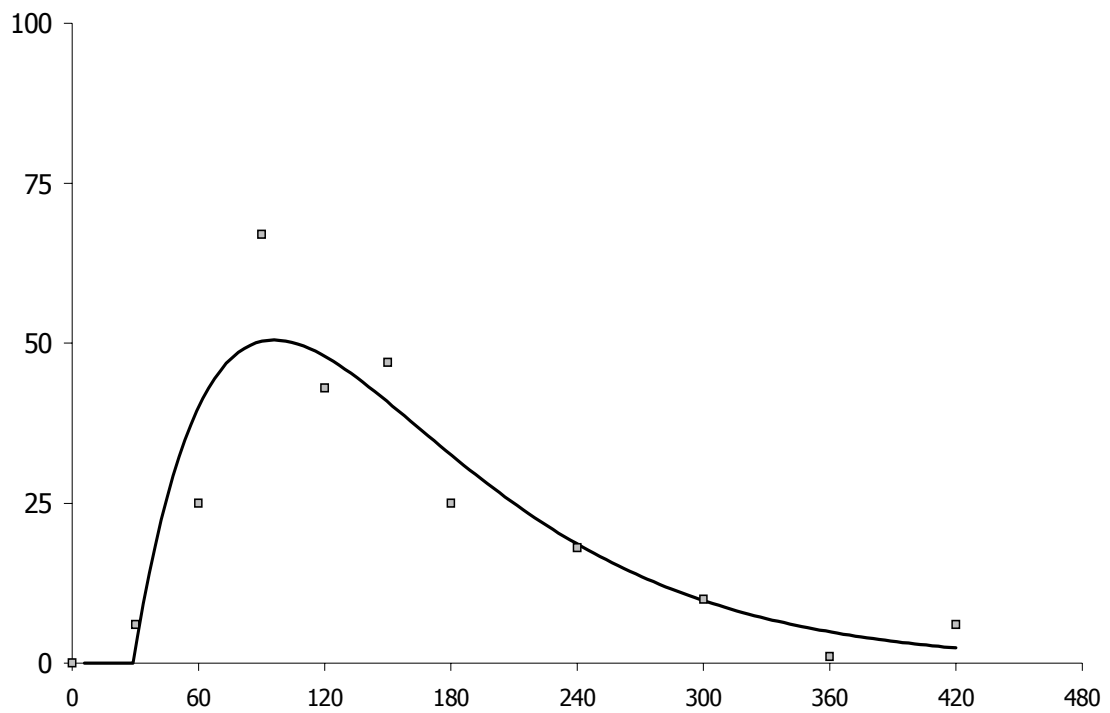


Diagramm 101 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_04, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

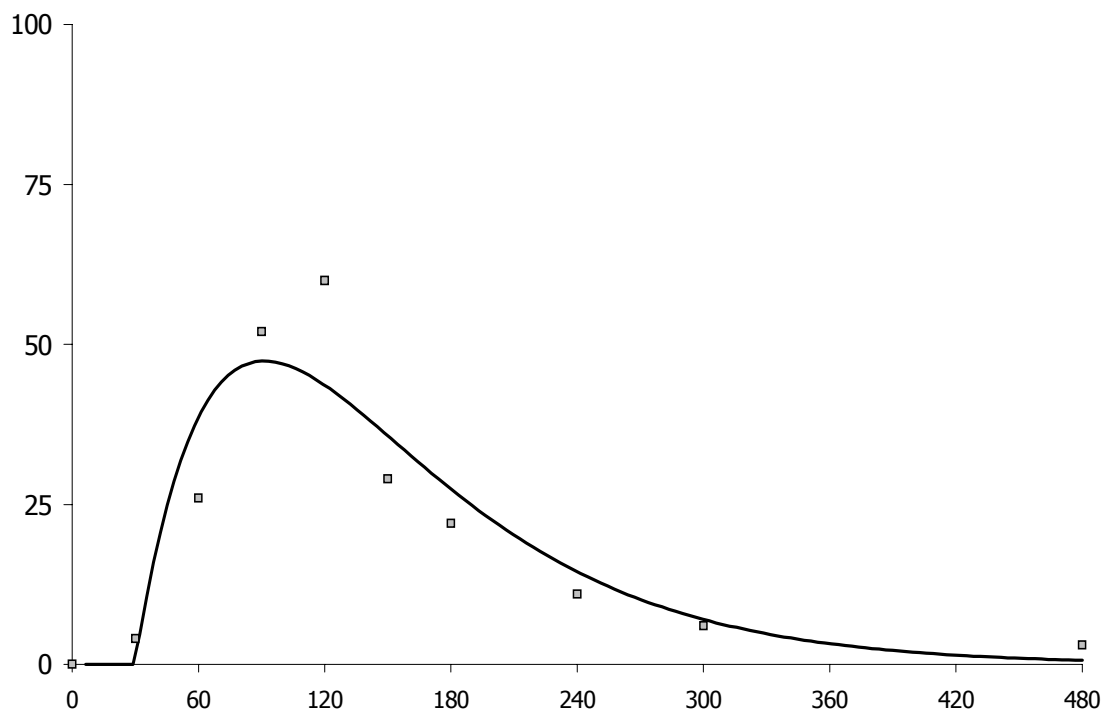


Diagramm 102 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_04, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

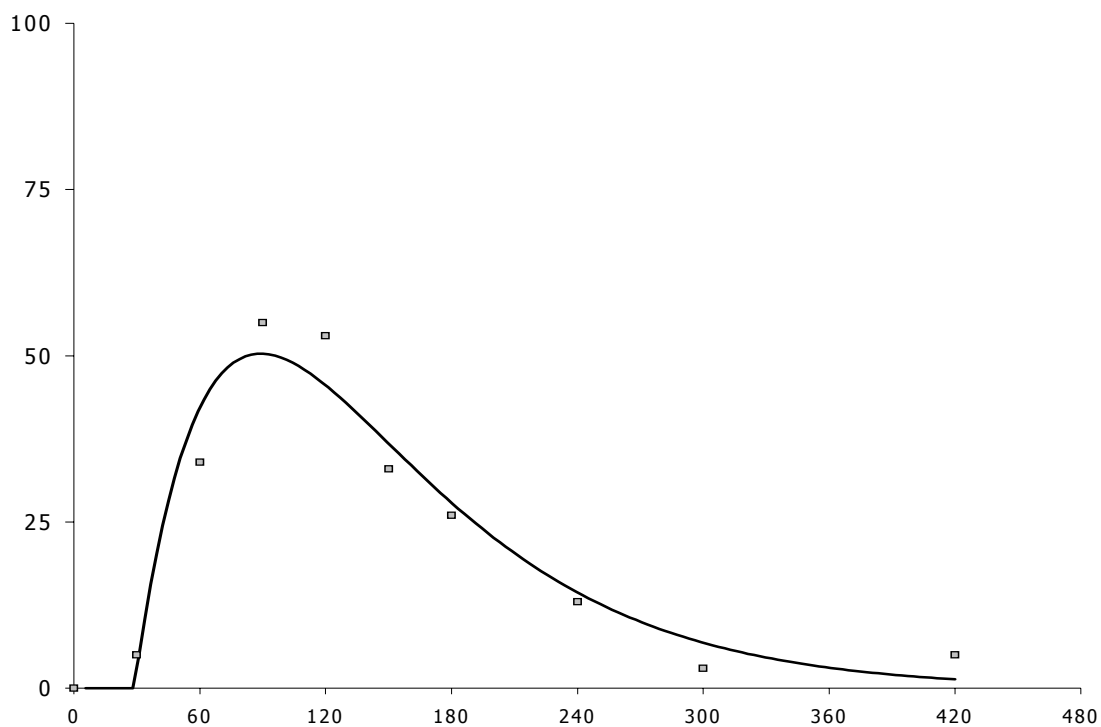


Diagramm 103 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_05, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

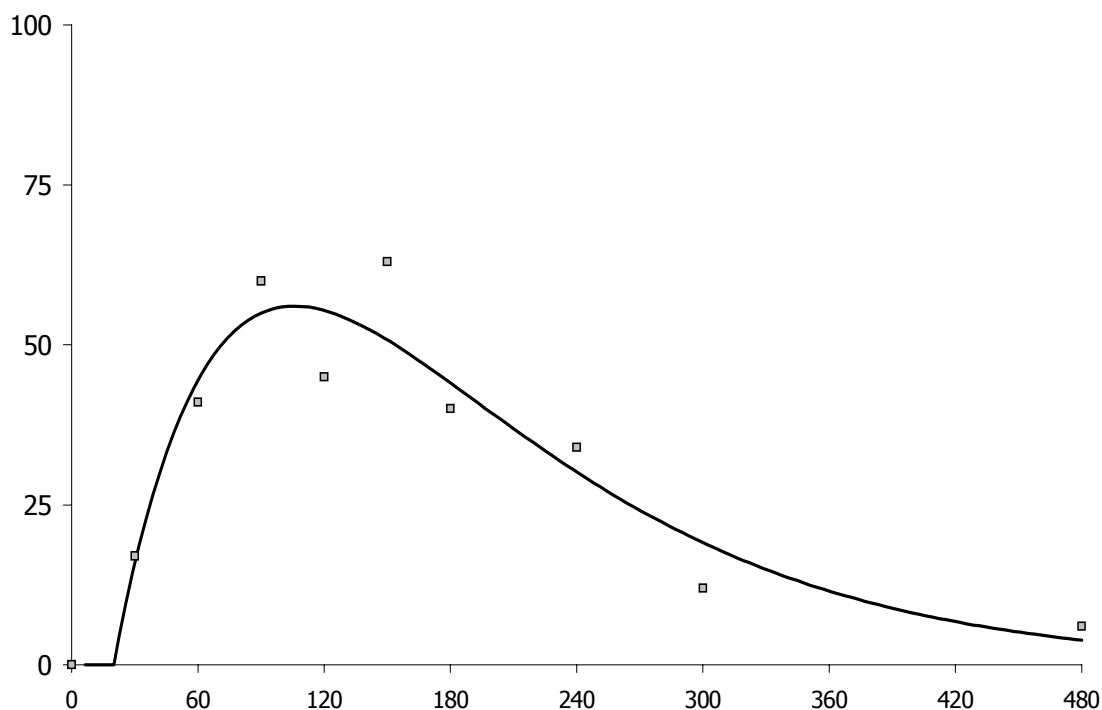


Diagramm 104 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_05, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

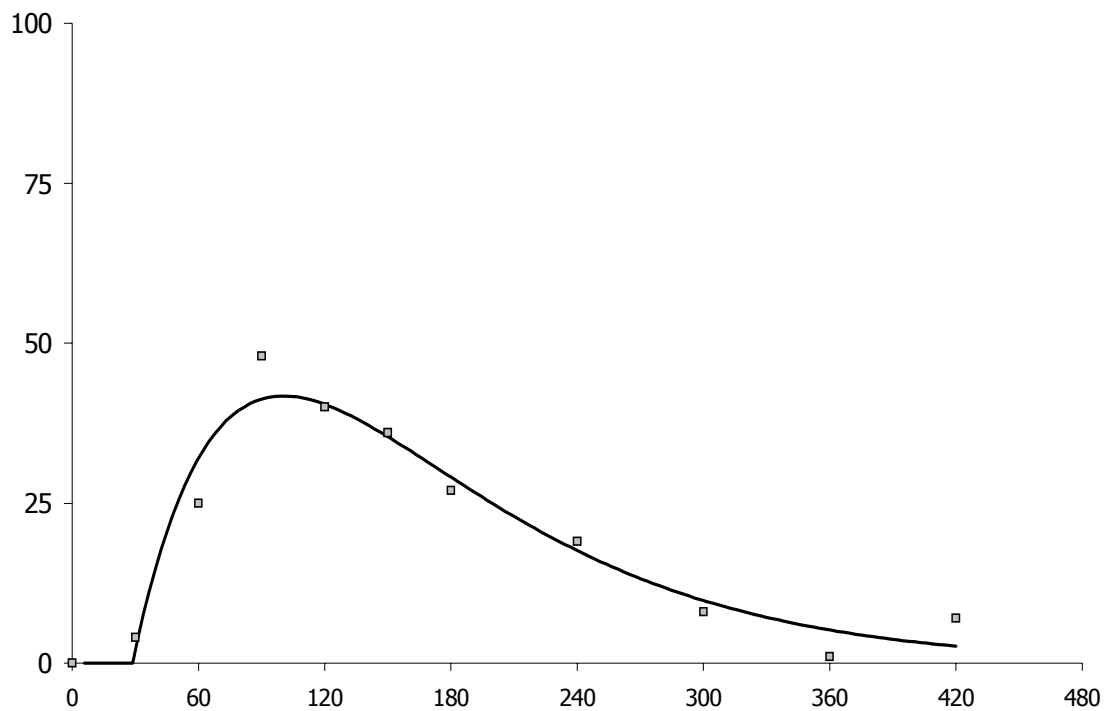
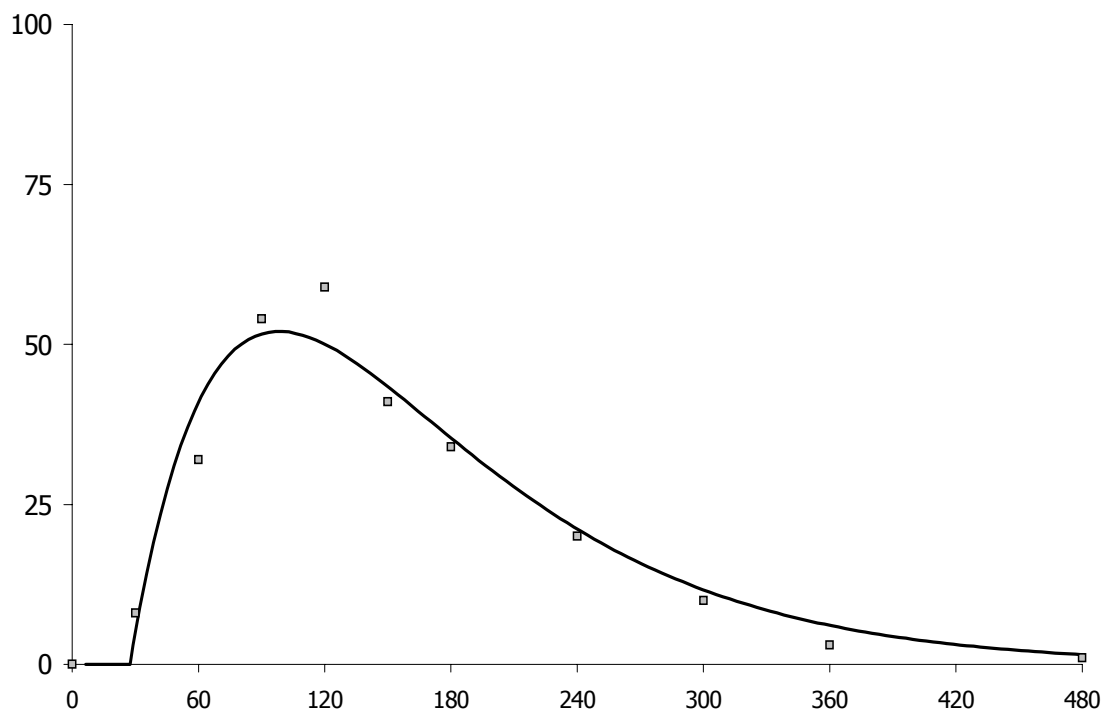


Diagramm 105 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_06, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]



5

Diagramm 106 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_06, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

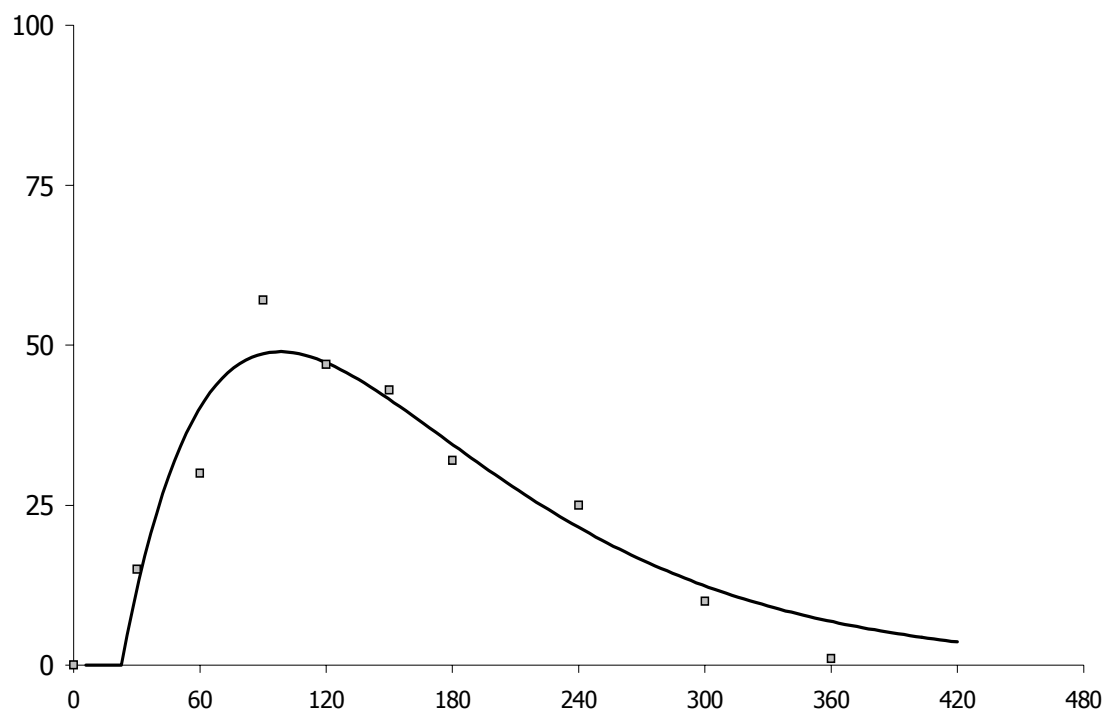


Diagramm 107 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_07, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

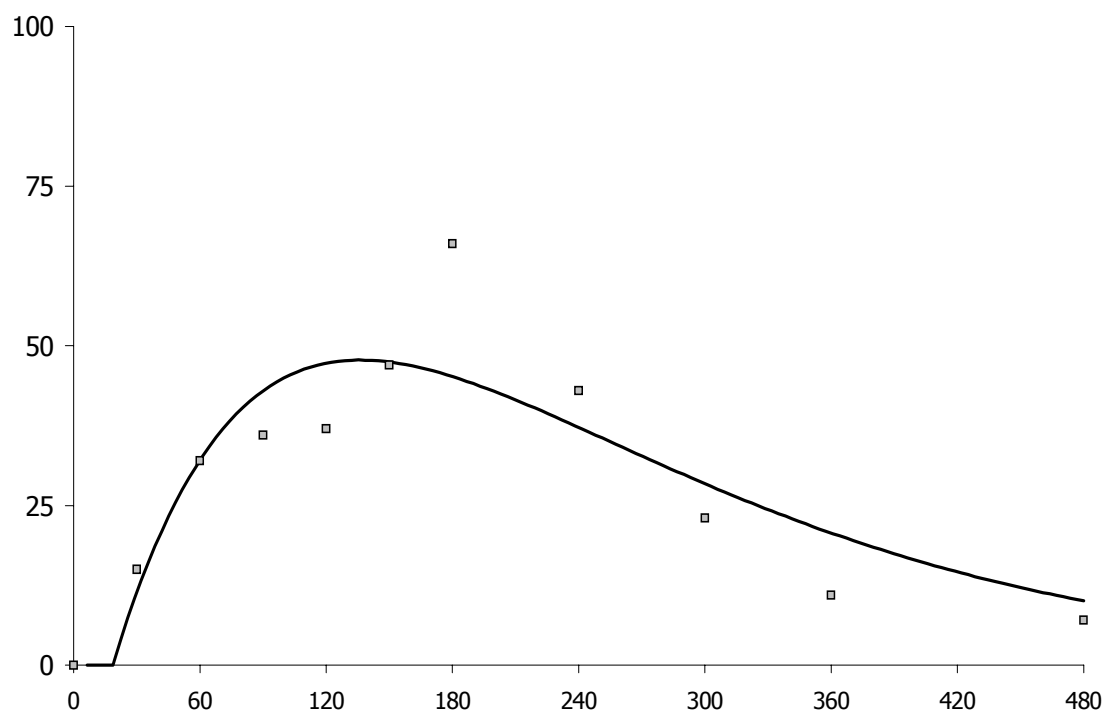


Diagramm 108 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_07, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

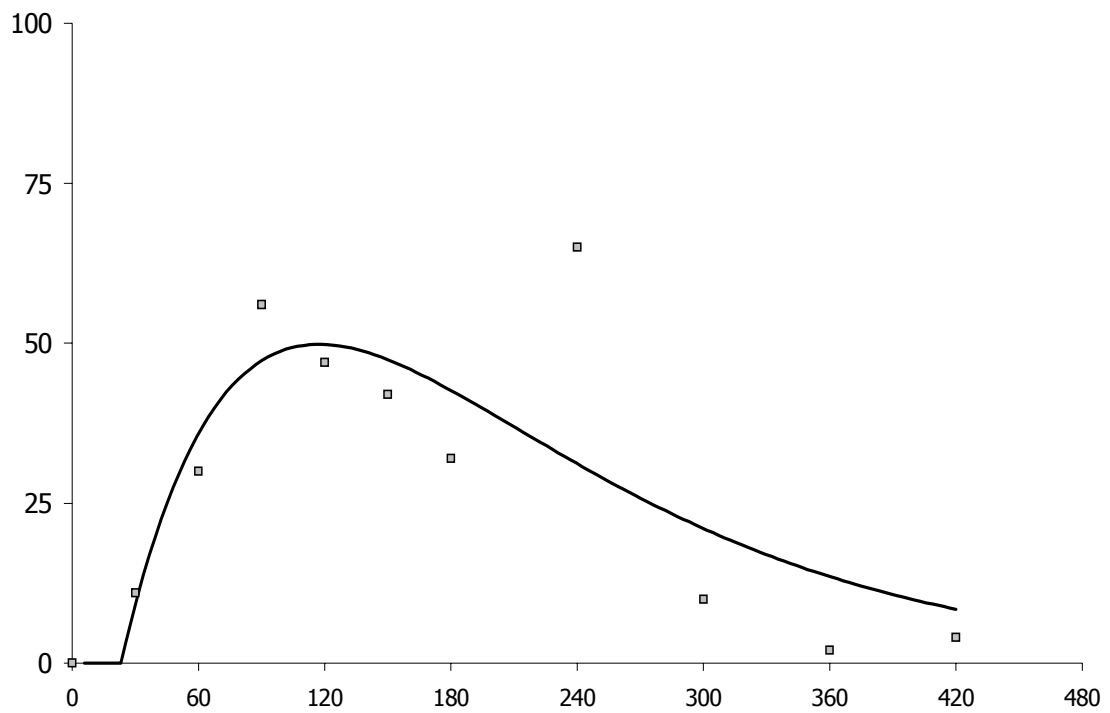
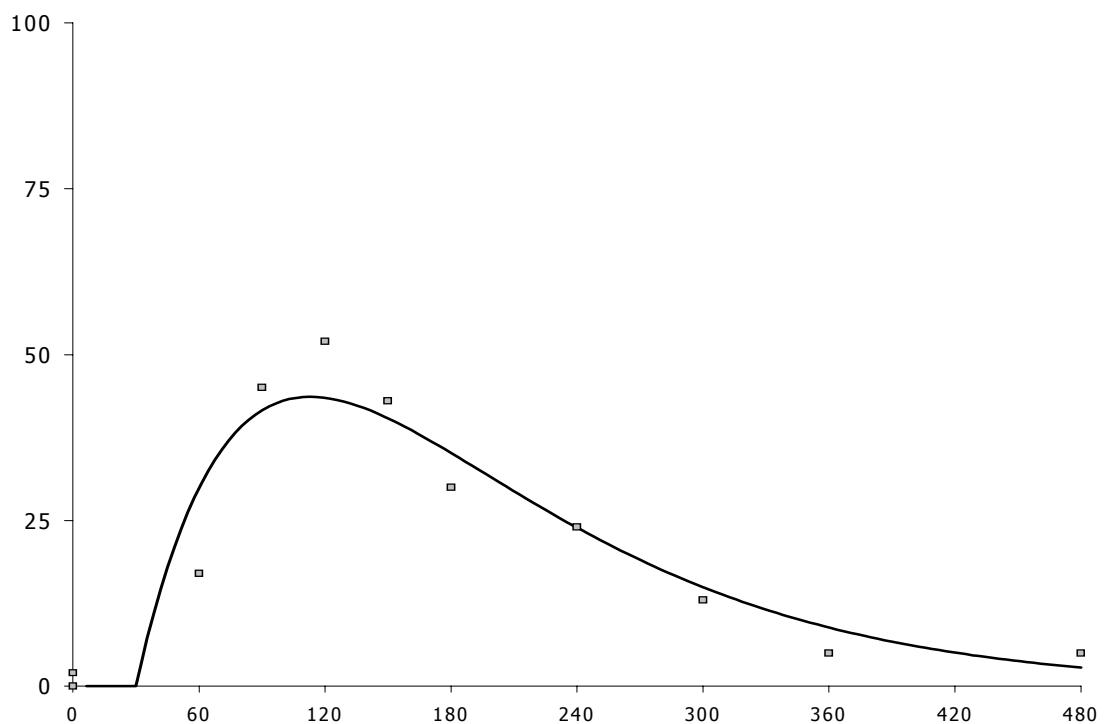


Diagramm 109 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_08, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]



5

Diagramm 110 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_08, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

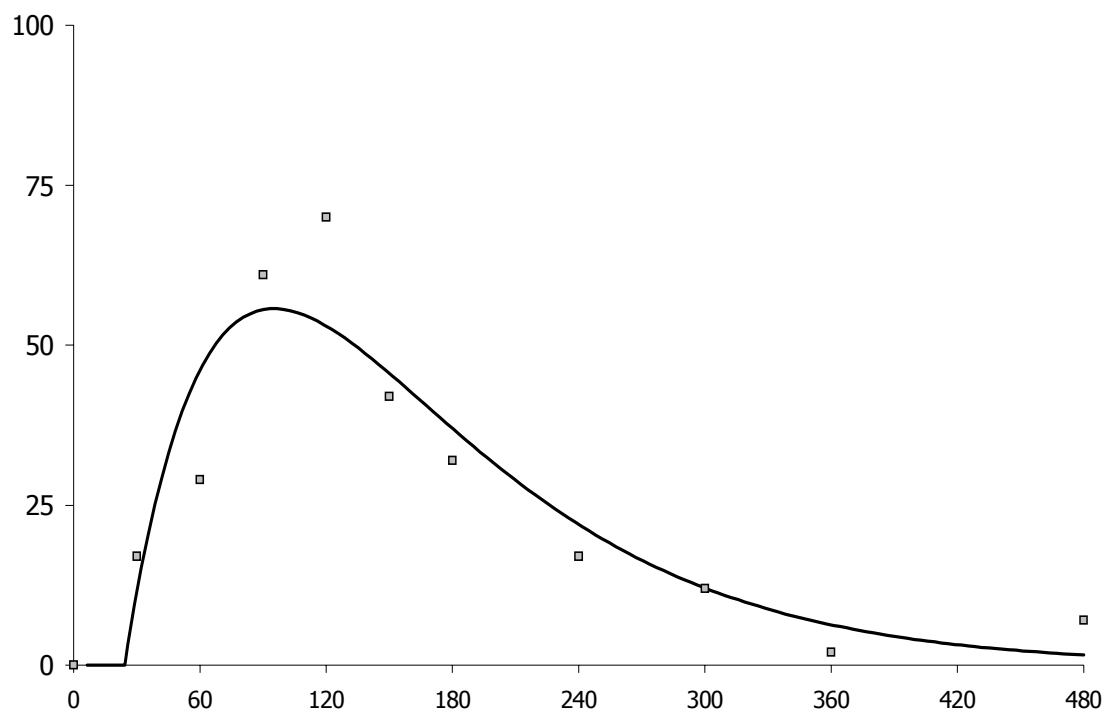


Diagramm 111 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_09, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

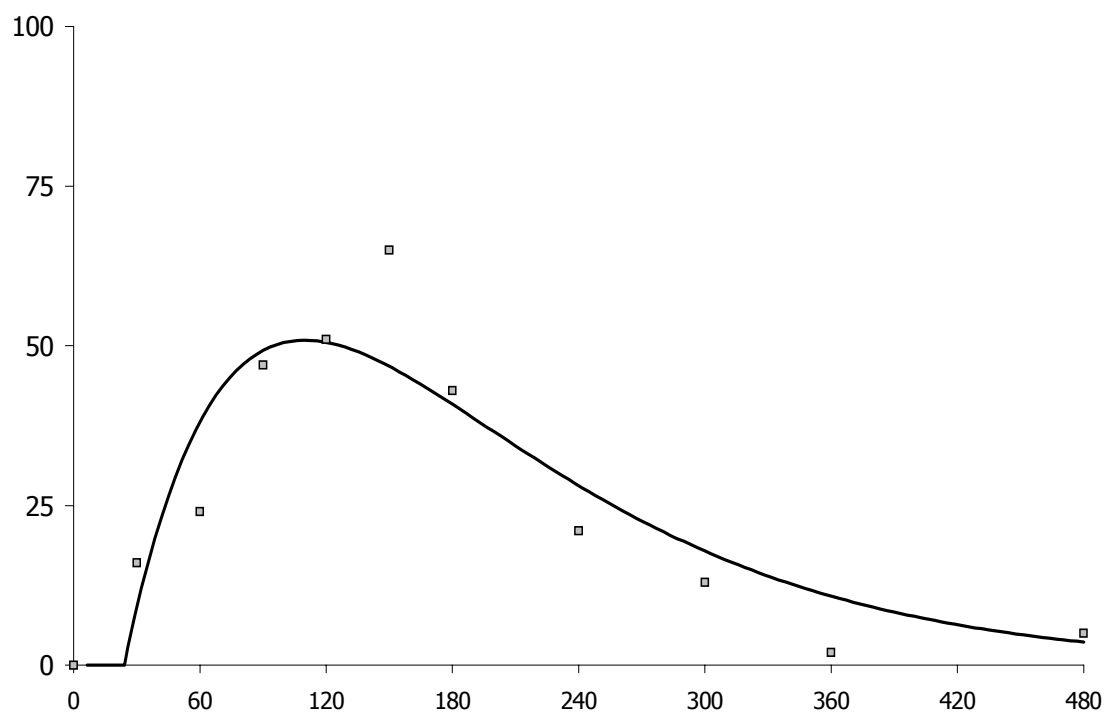


Diagramm 112 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_09, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

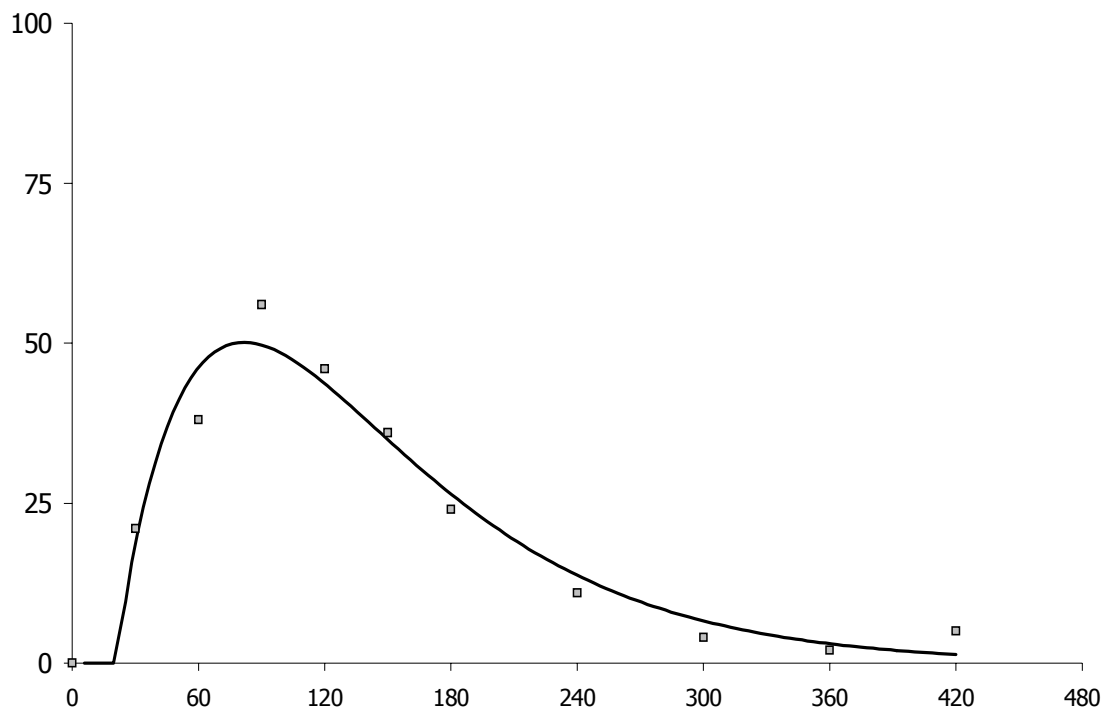
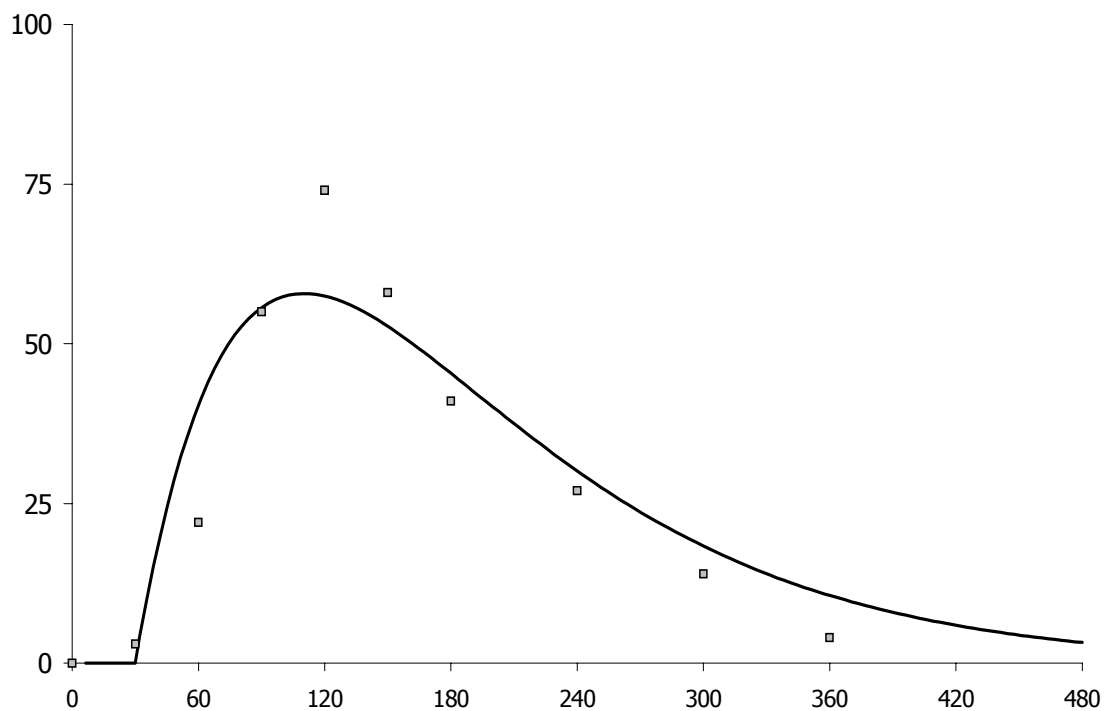


Diagramm 113 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_10, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]



5

Diagramm 114 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_10, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

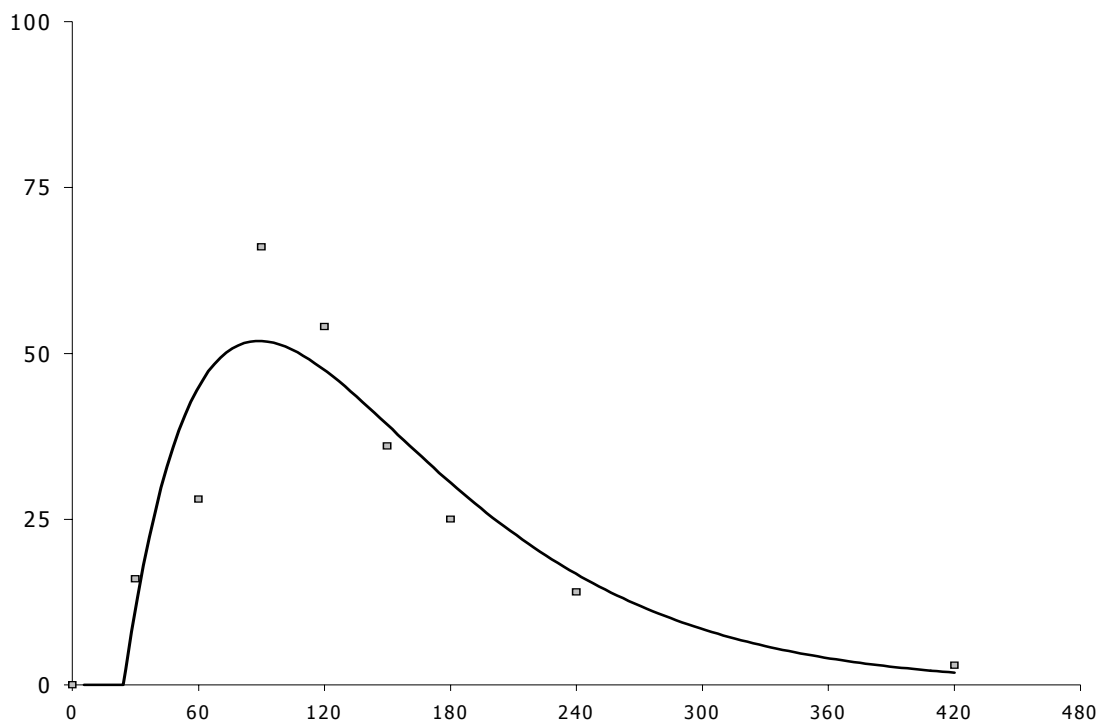


Diagramm 115 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_11, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

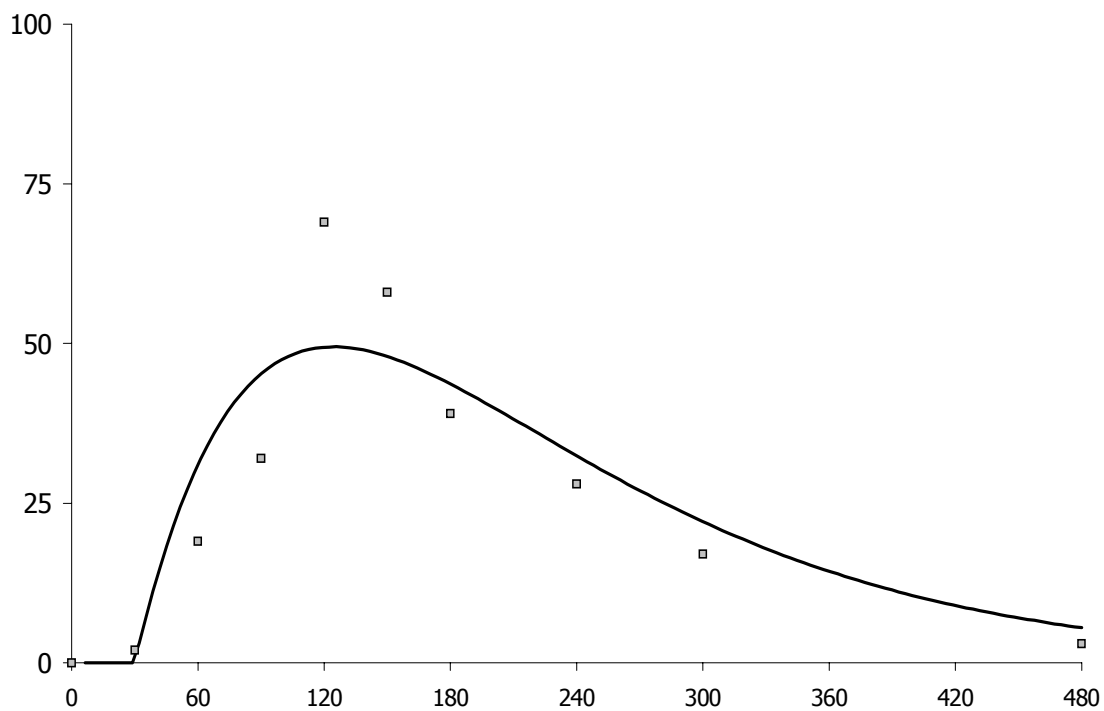


Diagramm 116 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_11, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

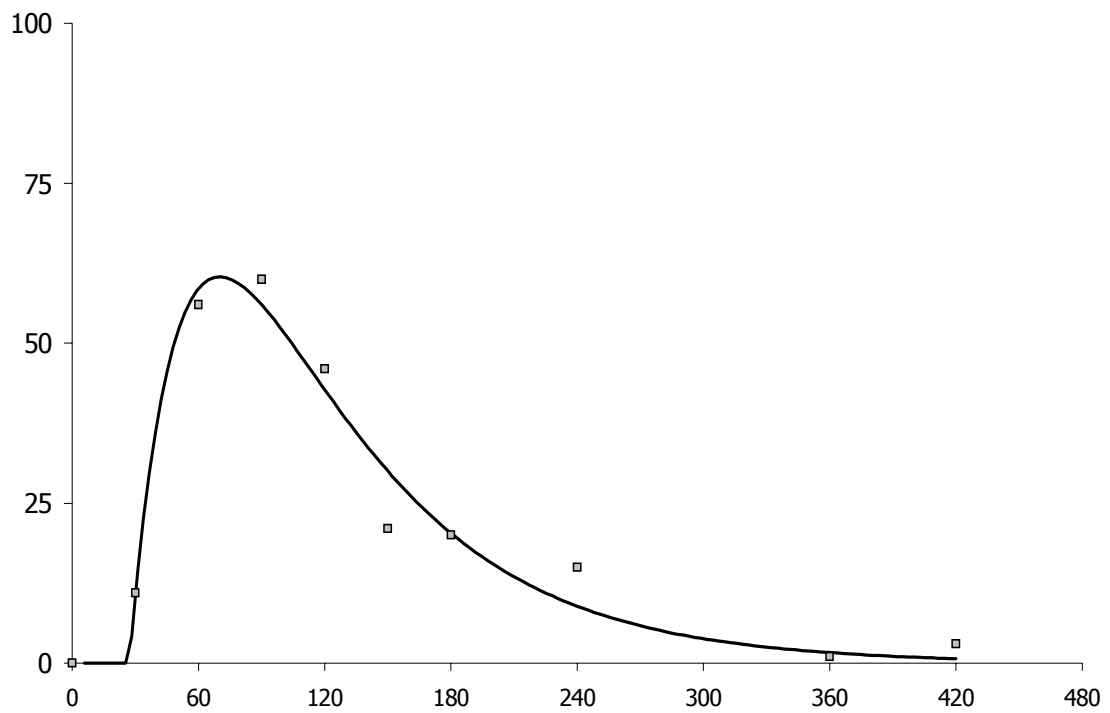
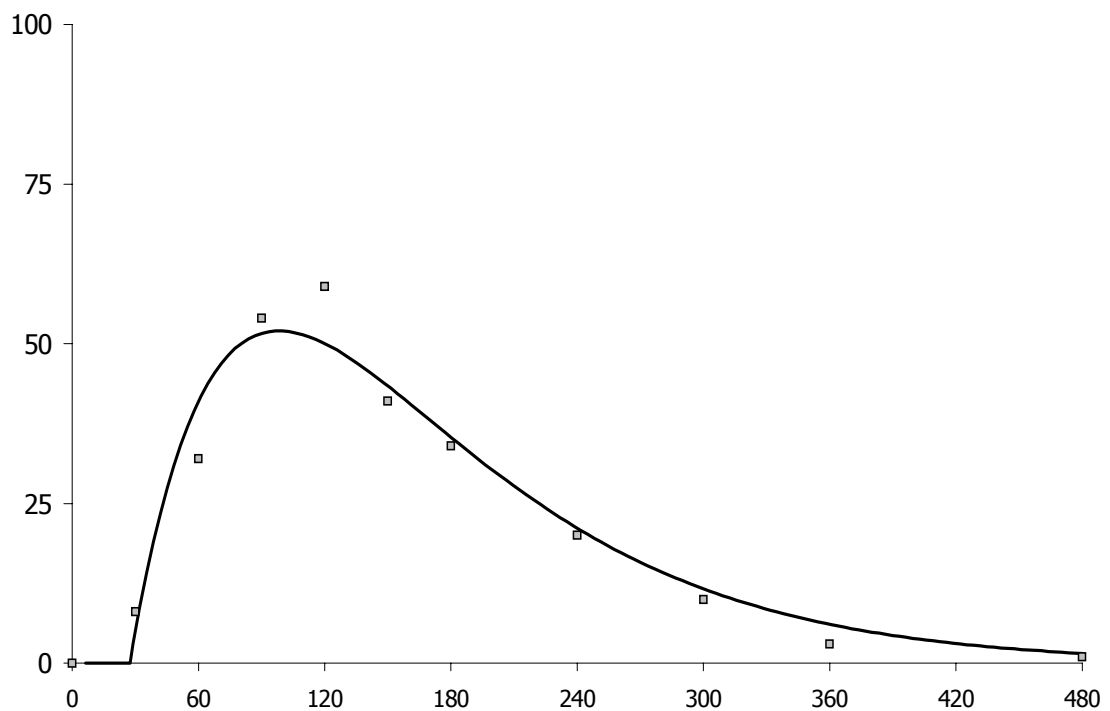


Diagramm 117 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_12, Testreihe_4; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]



5

Diagramm 118 Zunahme an totalem Vitamin B6 im Plasma von Versuchsperson_12, Testreihe_5; mathem. Kurvenverlauf mit 2-Komp.-Modell; x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Konzentration [nM]

7.2.2. Lebensmittel

B6-Gehalte in verzehrsfähiger Zubereitung: Die gemessenen Werte für Säfte und Kohlgemüse sind bereits im Ergebnisteil wiedergegeben.

7.2.2.1. sonstige Lösungen

5 Tabelle 99 Sonstige Flüssigkeiten: Gehalt an B6-Formen [nmol/l] in verzehrsfertiger Form

B6-Form	Schwarzer Tee (Aufguss) ⁸⁸	PN-HCl Reinsubstanz (Lösung) ⁸⁹	Injektionslösung ⁹⁰	Vitamintablette (in Wasser) ⁹¹
PLP	Spuren	0	0	<50
PL	0	Spuren	0	<50
PMP	n.b.	0	0	<50
PM	n.b.	0	0	<50
PN (frei)	<100	14.590	$4,86 \cdot 10^6$	9.170
PN (total)	<100	n.b.	n.b.	9.170
Vitamin B6 (frei)	<100	$14,6 \cdot 10^3$	$4,86 \cdot 10^6$	$9,2 \cdot 10^3$
Vitamin B6 (total)	<100	n.b.	n.b.	$9,2 \cdot 10^3$
gebundenes Vitamin B6	→0	n.b.	n.b.	0
PA (frei)	<200	500	<50	950
PA (total)	<200	n.b.	n.b.	950
<Vitamin B6+PA> (frei)	<300	$15,5 \cdot 10^3$	$4,86 \cdot 10^6$	$10,1 \cdot 10^3$
<Vitamin B6+PA> (total)	<300	n.b.	n.b.	$10,1 \cdot 10^3$
gebundenes <Vitamin B6+PA>	→0	n.b.	n.b.	0

⁸⁸ Mittelwert verschiedener Zubereitungen

⁸⁹ Lösung von 1,5 mg Reinsubstanz in 500ml Trinkvolumen, dies entspricht rechnerisch 14.591 nmol/l.

⁹⁰ 1 Ampulle (2ml) "Lichtenstein B-Komplex N", deklarierter Gehalt: 2 mg Vitamin B6, dies entspricht $4.863.813 \text{ nmol/l}$ PN-HCl.

⁹¹ 1 Brausetablette "Biolabor" in 1 l Bidest gelöst, deklarierter Gehalt: 2 mg Vitamin B6, dies entspricht 9.728 nmol PN-HCl.

7.2.2.2. Sprossen, Keimlinge

Tabelle 100 Sprossen und Keimlinge: Gehalt an B6-Formen [nmol/100g] in verzehrsfertiger Form

B6-Form	Soja	Mungbohne	Alfalfa	Kresse	Weizen	Roggen	Sonnenblume
PLP	8	18	14	84	n.b.		
PL	14	20	8	112			
PMP	7	9	4	63			
PM	19	49	26	55			
PN (frei)	53	111	78	204	$11,3 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^3$	150
PN (total)	109	142	159	496	$15,6 \cdot 10^3$	$7,2 \cdot 10^3$	170
Vitamin B6 (frei)	101	207	130	518			
Vitamin B6 (total)	157	238	211	810			
<i>gebundenes Vitamin B6</i>	<i>56</i>	<i>31</i>	<i>81</i>	<i>292</i>	<i>$4,3 \cdot 10^3$</i>	<i>$2,2 \cdot 10^3$</i>	<i>20</i>

5 7.2.3. Chromatografische Methode

Tabelle 101 Freie B6-Formen [nmol/l] im Nüchternblut von Versuchsperson 01 nach verschiedenen Aufbereitungen.

B6-Form	Plasma (T1)	Vollblut	Plasma (EDTA-Aufbereitung)
PLP	35	> 100	34
PL	4	n.b.	4
PMP	5	n.b.	5
PM	3	n.b.	4
PN	3	5	3
Vitamin B6	50		50
PA	5	8	6
<Vitamin B6+PA>	55		56

Das folgende Diagramm zeigt den Konzentrationsverlauf während 8-stündiger Glucosidase-Inkubation für freies PN (—) und freie PA (- -) sowie zum Vergleich freies PN ohne Enzymzusatz inkubiert (—). Die eingezeichneten Mittelwerte aus verschiedenen Probenmatrices sind als Prozentwerte der jeweiligen Ausgangskonzentration (100) aufgetragen. Nach einer Inkubation von sechs Stunden ist ein deutlicher Abfall der PN-Konzentration bzw. eine Zunahme der PA festzustellen. Die Inkubationsdauer während der Analysen betrug 250 Minuten (4h 10').

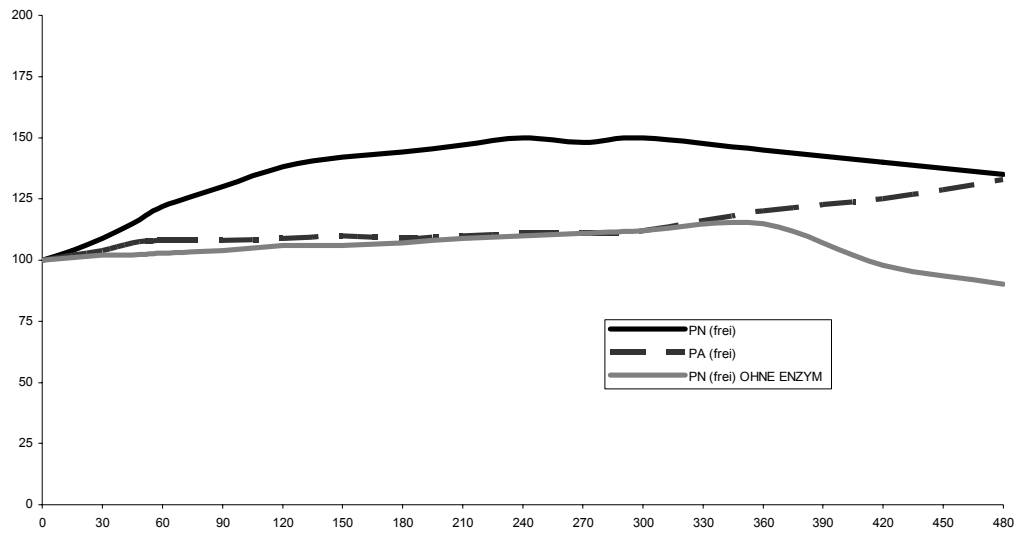
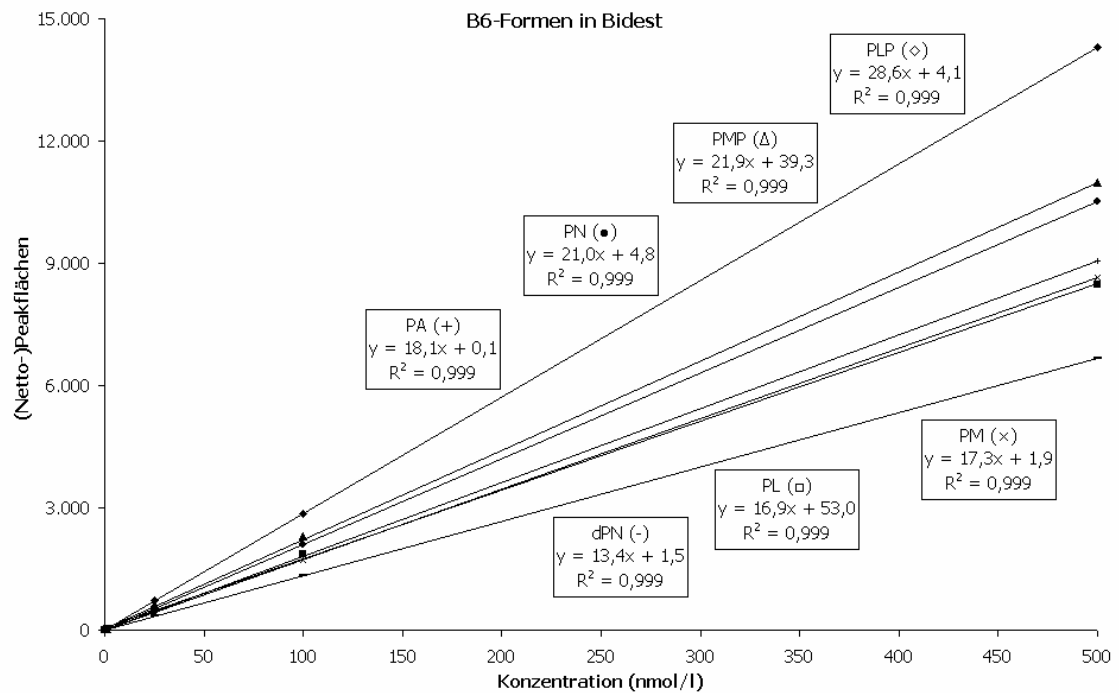


Diagramm 119: Zunahme des freien PN beim Inkubieren von Proben (Mittelwerte); x-Achse: Zeit [min], y-Achse: Zunahme-% (Ausgangskonzentration = 100)

7.3. Eichung und Kalibrierung

7.3.1. Eichgeraden Wasser



5 Diagramm 120 Eichgeraden der B6-Formen, Matrix: Bidest; x-Achse: Konzentration (nmol/l) der Messlösung, y-Achse: Peakfläche (10^3)

Tabelle 102 Messwerte (Peakflächen) der Eichreihe in Bidest

Konzentration nmol/l	PLP	PMP	PL	PM	PN	PA	dPN
0,125	3,7	2,8	2,2	4,6	7,4	1,8	4,0
1	29,9	26,0	19,9	19,8	25,8	17,7	14,6
25	733,5	608,7	486,5	433,8	529,8	452,4	335,9
100	2.856,3	2.296,7	1.856,9	1.732,5	2.104,8	1.811,3	1.332,9
500	14.308,6	10.977,4	8.473,2	8.656,3	10.505,0	9.047,9	6.669,1

7.3.2. Eichgeraden Plasma

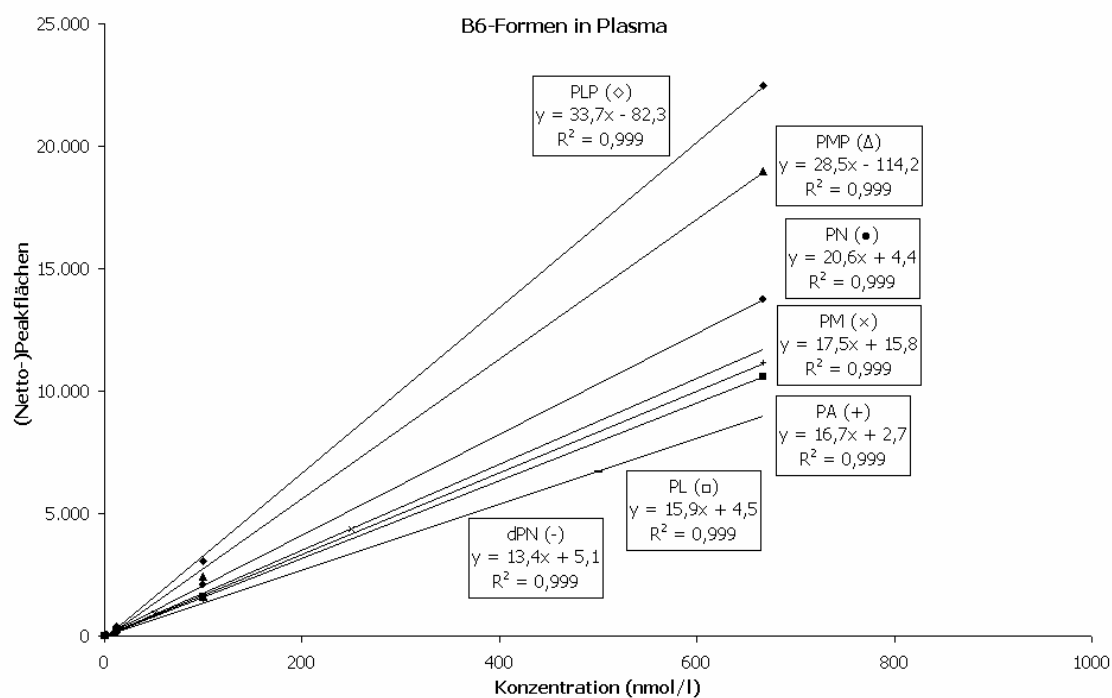


Diagramm 121 Eichgeraden der B6-Formen, Matrix: Plasma; x-Achse: Konzentration (nmol/l) der Messlösung, y-Achse: Peakfläche (10^3)

5 Tabelle 103 Messwerte (Peakflächen) der Eichreihe in Plasma

Konzentration nmol/l	PLP	PMP	PL	PM	PN	PA	dPN
0,25	7,2	5,6	4,4	5,2	10,5	18,3	
0,5				11,5			
1	28,8	18,3	19,0		24,3	29,4	11,2
5				89,0			
10							72,8
12,5	366,4	288,7	213,4		263,0	366,3	
50				942,7			
100	3.074,7	2.431,5	1.584,0		2.063,5	1.464,5	1.440,4
250				4.377,1			
500							6.710,4
667	22.456,3	18.964,3	10.580,1		13.745,7	11.143,2	

7.3.3.

Eichgeraden Urin

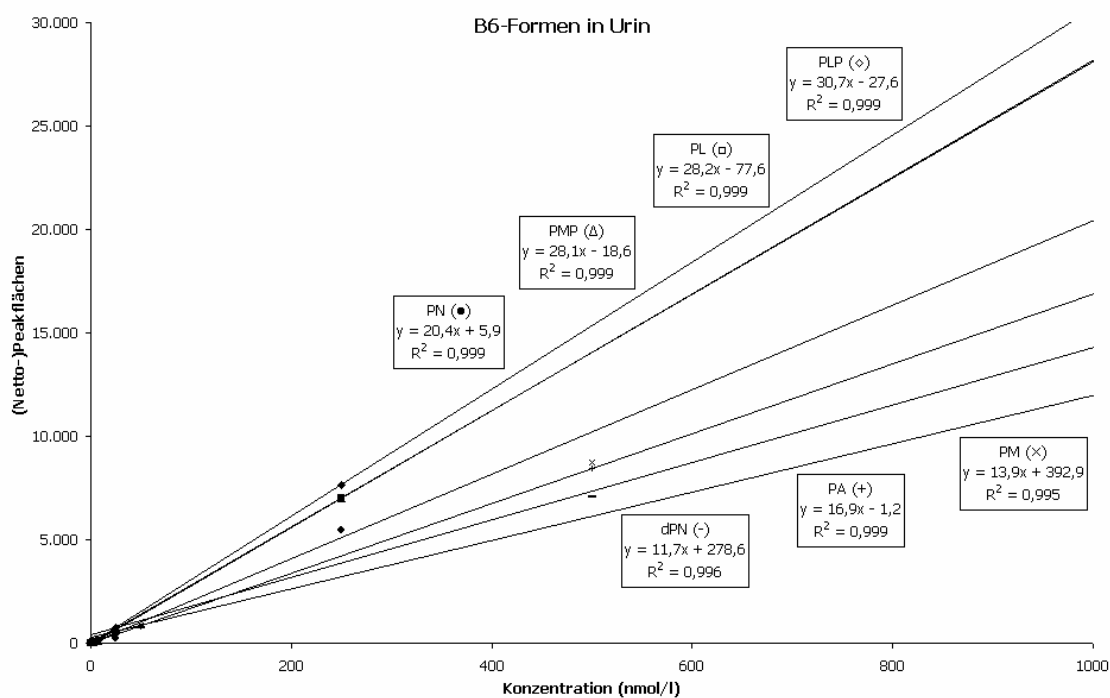


Diagramm 122 Eichgeraden der B6-Formen, Matrix: Urin; x-Achse: Konzentration (nmol/l) der Messlösung, y-Achse: Peakfläche (10^3)

5 Tabelle 104 Messwerte (Peakflächen) der Eichreihe in Urin

Konzentration nmol/l	PLP	PMP	PL	PM	PN	PA	dPN
0,1	1,3	1,0	1,0		1,8	1,7	
0,5				11,6		8,6	7,9
2	58,4	53,6	33,6		35,9		
2,5						43,2	
5				121,3			63,7
6,67	139,8	121,8	78,6		147,0		
25	725,2	699,8	518,7		223,6		
50				838,6		829,1	725,9
250	7.653,3	7.014,9	6.993,5		5.484,5		
500				8.708,8		8.454,8	7.074,2
1333					27.186,5		
1750				24.360,4		29.547,7	20.454,1

7.3.4.

Eichgeraden Blumenkohl

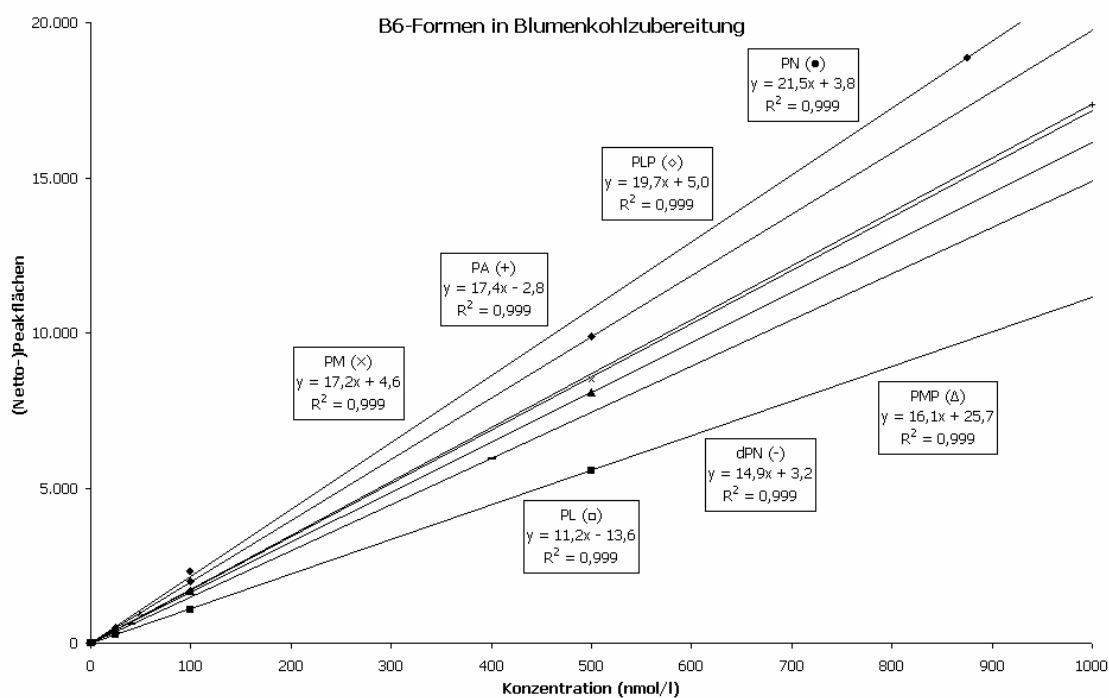


Diagramm 123 Eichgeraden der B6-Formen, Matrix: Blumenkohlzubereitung; x-Achse: Konzentration (nmol/l) der Messlösung, y-Achse: Peakfläche (10^3)

5 Tabelle 105 Messwerte (Peakflächen) der Eichreihe in Blumenkohlzubereitung

Konzentration nmol/l	PLP	PMP	PL	PM	PN	PA	dPN
0,2	2,5	1,8	1,2		2,0	1,0	
0,4							8,6
0,5				4,8			
1	18,9	16,6	5,6		11,0	6,7	
2,5				26,9			
4							65,3
25	499,8	446,5	269,7		434,2	431,5	
40							619,1
50				959,7			
100	1.993,4	1.679,9	1.070,4		2.300,3	1.743,0	
400							5.928,7
500	9.874,2	8.069,0	5.568,3	8.491,8			
875					18.843,2		
1000						17.371,3	
1667				28.636,0			
2000							29.775,0

7.3.5.

Eichgeraden Saft

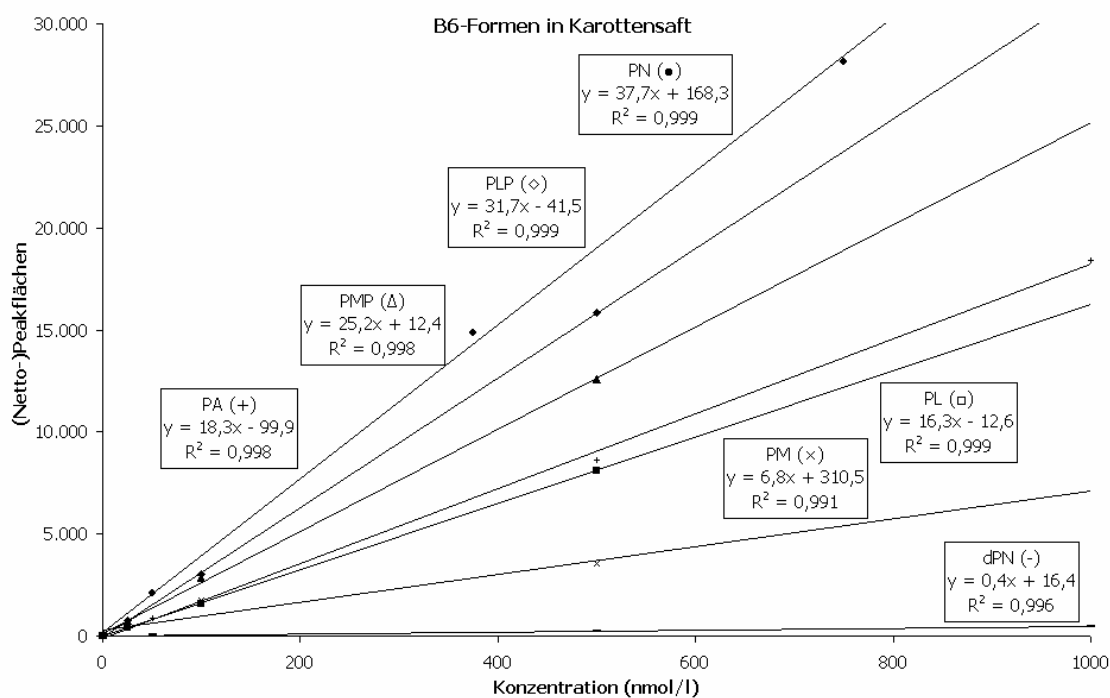


Diagramm 124 Eichgeraden der B6-Formen, Matrix: Karottensaft; x-Achse: Konzentration (nmol/l) der Messlösung, y-Achse: Peakfläche (10^3)

5 Tabelle 106 Messwerte (Peakflächen) der Eichreihe in Karottensaft

Konzentration nmol/l	PLP	PMP	PL	PM	PN	PA	dPN
0,1				1,8		1,7	
0,125	2,0	2,0	1,8				
0,2					9,4		
1	29,2	27,1	16,1	18,2	38,2	17,2	1,2
25	755,8	733,2	384,0	459,9			
50					2.114,4	847,8	48,7
100	3.028,1	2.845,6	1.594,3	1.776,3			
375					14.855,7		
500	15.842,5	12.578,3	8.122,7	3.562,2		8.596,3	243,6
750					28.156,9		
1000						18.436,7	442,6

In den Diagrammen der Abschnitte 7.3.1 bis 7.3.5 sind der Übersicht halber nur Konzentrationen bis 1 $\mu\text{mol/l}$ dargestellt, höhere Werte wurden jedoch – sofern noch linear – für die Berechnungen (siehe Tabelle 107) berücksichtigt.

7.3.6. Zusammenfassung der Eichwerte

Tabelle 107 Übersicht der Eichgeraden und Messgrenzen [nmol/l]

Bidest	PLP	PMP	PL	PM	PN	PA	dPN
Eichgerade	$y=28,6x+4,1$	$y=21,9x+39,3$	$y=16,9x+53,0$	$y=17,3x+1,9$	$y=21,0x+4,8$	$y=28,6x+4,6$	$y=28,6x+4,7$
R ²	0,9999	0,9999	0,9996	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
Nachweisgrenze	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	<0,05	0,25
Bestimmungsgrenze	0,25	0,25	0,33	0,30	0,25	0,10	0,33
Plasma	PLP	PMP	PL	PM	PN	PA	dPN
Eichgerade	$y=33,7x-82,3$	$Y=28,5x-114,2$	$y=15,9x+4,5$	$y=17,5x+15,8$	$y=20,6x+4,4$	$y=16,7x+2,7$	$y=13,4x+5,1$
R ²	0,9998	0,9995	0,9999	0,9998	0,9999	0,9993	0,9996
Nachweisgrenze	0,10	0,10	0,15	0,15	0,10	0,05	0,22
Bestimmungsgrenze	0,33	0,33	0,40	0,40	0,33	0,20	0,50
Urin	PLP	PMP	PL	PM	PN	PA	dPN
Eichgerade	$y=30,7x-27,6$	$Y=28,4x-18,6$	$y=28,2x-77,6$	$y=13,9x+392,9$	$y=20,4x+5,9$	$y=16,9x-1,2$	$y=11,76x+278,6$
R ²	0,9999	0,9999	0,9994	0,9947	0,9996	0,9999	0,9963
Nachweisgrenze	0,10	0,10	0,15	0,15	0,15	0,10	0,25
Bestimmungsgrenze	0,33	0,33	0,40	0,40	0,33	0,33	0,50
Karottensaft	PLP	PMP	PL	PM	PN	PA	dPN
Eichgerade	$y=31,7x-41,5$	$Y=25,2x+12,4$	$y=16,3x-12,6$	$y=6,8x+310,5$	$y=37,7x+168,3$	$y=18,3x-99,9$	$y=0,4x+16,4$
R ²	0,9999	0,9983	0,9999	0,9111	0,9993	0,9989	0,9958
Nachweisgrenze	0,10	0,10	0,15	0,15	0,15	0,05	0,25
Bestimmungsgrenze	0,33	0,33	0,40	0,40	0,40	0,20	0,50
Blumenkohlzubereitung	PLP	PMP	PL	PM	PN	PA	dPN
Eichgerade	$y=19,7x+5,0$	$Y=16,1x+25,7$	$y=11,2x-13,6$	$y=17,2x+4,6$	$y=21,5x+3,8$	$y=17,4x-2,8$	$y=14,9x+3,2$
R ²	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
Nachweisgrenze	0,10	0,10	0,15	0,15	0,10	0,08	0,20
Bestimmungsgrenze	0,33	0,33	0,40	0,40	0,33	0,25	0,50

- Die in der vorstehenden Tabelle genannten Werte für die (untere) Bestimmungsgrenze (LOQ) geben als untersten quantifizierbaren Wert die dreifache Grundlinienschwankung der Detektionsaufzeichnung an, sofern dieser im linearen Bereich der Eichung lag; andernfalls wurde ein geeigneter höherer Wert angegeben. Als (untere) Nachweisgrenze wurde die doppelte Grundlinienschwankung herangezogen, sofern diese in mindestens vier aufeinanderfolgenden Messungen erreicht wurde. Alle angegebenen Werte beziehen sich auf die messfertige Lösung ohne Berücksichtigung der Probenaufbereitung.

7.3.7. Interserien-Schwankungen

Tabelle 108 Interserien-Schwankung (Mittelwert in verschiedenen Matrices)

B6-Form	mittlere Interserien-Schwankung in versch. Matrices ⁹²	± SD
PLP	6,3 %	0,9
PMP	8,4 %	1,2
PL	4,6 %	0,9
PM	7,7 %	1,0
PN	3,7 %	0,6
PA	7,2 %	0,8
dPN	11,2 %	2,4

5 Zu den Berechnungen in dieser und der nachfolgenden Tabelle siehe Abschnitt "Reproduzierbarkeit" (Hauptversuche).

7.3.8. Intraserien-Schwankungen

Tabelle 109 Interserien-Schwankung (Mittelwert in verschiedenen Matrices)

B6-Form	mittlere Intraserien-Schwankung in versch. Matrices	± SD
PLP	4,5 %	0,6
PMP	5,0 %	0,6
PL	4,4 %	0,8
PM	5,2 %	0,9
PN	2,0 %	0,4
PA	2,9 %	0,2
dPN	9,8 %	1,9

7.3.9. Wiederfindung

10 Tabelle 110 Wiederfindungsraten (%) in verschiedenen Matrices

B6-Form	Aufbereitung ⁹³	Bidest	Plasma	Urin	Karottensaft	Blumenkohlzubereitung	Mittelwert	± SD
PLP	R	99,8	104,4	96,9	96,8	101,3	99,8	3,2
PMP	R	98,8	98,3	91,4	102,2	97,7	97,7	3,9
PL	I	97,7	94,2	103,4	98,6	95,4	97,9	3,6
PM	I	99,3	101,1	92,2	96,3	99,5	97,7	3,5
PN	I	100,8	99,3	98,9	100,4	97,2	99,3	1,4
PA	I	98,0	93,8	96,6	95,5	94,7	95,7	1,6
dPN	I	93,5	88,9	90,7	78,6	94,1	89,2	6,3

⁹² Bidest, Plasma, Urin, Karottensaft, Blumenkohlzubereitung

⁹³ Erläuterung der Aufbereitungsverfahren siehe Abschnitt 3.2.4 (Methode)

"Es kann mich niemand daran hindern, über Nacht klüger zu werden."

(Konrad Adenauer)

Allen, die mich unterstützt haben

Danke